
Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional La Plata

“Aplicación de un sistema para la remoción de
hidrocarburos de petróleo combinando tratamientos
biológicos y químicos en matrices contaminadas
artificialmente”

Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental

AUTOR: Esp. Lic. YAMILA S. OBED

DIRECTOR: Dra. MARCELA A. FERRERO

CO-DIRECTOR: Dr. MAURICIO J. ALESSANDRELLO

2021

Agradecimientos

A mi Directora de Tesis, la Dra. Marcela Ferrero, por haber hecho posible este trabajo brindándome mucho más que su conocimiento y supervisión. Por su calidad humana.

A mi Co-Director de Tesis, el Dr. Mauricio Alessandrello, por compartir y guiarme en el trabajo experimental y en el análisis de los resultados obtenidos. Por su paciencia y excelente predisposición.

A todo el PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos-CONICET) y en especial a su Directora, Dra. Lucía I. Castellanos de Figueroa, por haber proporcionado el lugar físico y equipamiento para la concreción del presente trabajo, en un entorno de excelencia académica.

A la Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional La Plata, por brindarme en el espacio de la Maestría, la posibilidad del intercambio interdisciplinario, tan necesario y fructífero para fortalecer la visión crítica en la actividad profesional. A mis compañeros y amigos de la Maestría por tantas interesantes y estimulantes horas compartidas.

A la educación pública, por mi formación y la de tantos compatriotas a quienes da invaluable herramientas para el crecimiento personal y profesional. Por hacernos libres e independientes.

A Luis Cavanna por permitirme destinar horas de trabajo al estudio. A Fede Saracino, por colaborar en la elaboración de los esquemas de flujo de los reactores y en la edición del documento.

A mis amigos, por estar siempre, compartiendo la vida. A los biólogos además, por sus aportes durante el desarrollo de la tesis y por los hermosos e inolvidables años de facultad que nos llevaron a cumplir nuestros sueños.

A mis padres, Soledad y Hugo, mis hermanos, Mora y Hugo, mis abuelos (querida Abi) y sobrinos por la confianza, incentivo y amor de siempre. Por ser mi orgullo y sostén en la vida y por compartir el amor y curiosidad por la naturaleza.

A Pablo, mi gran amor y compañero, por su paciencia y por estar a mi lado y apoyarme tanto en este como en todos mis proyectos. Por hacerme feliz.

Índice

1	Introducción	4
1.1	<i>Los hidrocarburos de petróleo y su presencia en el ambiente</i>	4
1.2	<i>Tratamientos biológicos: Biorremediación</i>	8
1.2.1	Métodos de biorremediación	10
1.2.2	Biorremediación en Argentina	15
1.2.2.1	Interacción entre las partes involucradas	15
1.2.2.2	Líneas de investigación	17
1.3	<i>Tratamientos de remediación química</i>	20
1.4	<i>Tratamientos biológicos y químicos combinados</i>	22
1.5	<i>Hipótesis y objetivos</i>	26
2	Materiales y métodos	27
2.1	<i>Microorganismos</i>	27
2.2	<i>Diseño experimental-medio líquido</i>	28
2.2.1	Biorreactores y condiciones de cultivo	28
2.2.2	Tratamiento químico con reactivo de Fenton	33
2.2.3	Determinación de HAPs	34
2.2.4	Cuantificación de biomasa bacteriana	34
2.3	<i>Diseño experimental-suelo</i>	35
2.3.1	Microcosmos y biorremediación de suelo	35
2.3.2	Tratamiento químico con reactivo de Fenton	39
2.3.3	Extracción y cuantificación del petróleo	39
3	Resultados y discusión	40
3.1	<i>Medio líquido</i>	40
3.1.1	Remoción de HAPs: biorremediación	40
3.1.1.2	Cuantificación de biomasa bacteriana	46
3.1.2	Post tratamiento químico con reactivo de Fenton	48
3.1.2.1	Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en ensayos con cultivos puros y mixtos	53
3.2	<i>Suelo</i>	57
3.2.1	Remoción de petróleo: bioaumentación y tratamiento con reactivo de Fenton	57
4	Conclusiones	62
5	Bibliografía	65

Listado de Gráficos

Gráfico 3-1. Remoción de acenafteno en cultivos puros de P26, H19 y en muestras Control. (*tratamiento de 72 h para ambas cepas** tratamiento de 48 h para H19). (Error del 5 %)	40
Gráfico 3-2. Remoción de fluoranteno en cultivos puros de P26, H19 y en muestras Control. (*tratamiento de 72 h para ambas cepas **tratamiento de 48 h para H19). (Error del 5 %)	41
Gráfico 3-3. Remoción de pireno en cultivos puros de P26, H19 y en muestras Control. (*tratamiento de 72 h para ambas cepas **tratamiento de 48 h para H19). (Error del 5 %)	41
Gráfico 3-4. Remoción de acenafteno en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 48 h). (Error del 5 %)	42
Gráfico 3-5. Remoción de fluoranteno en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 48 h). (Error del 5 %)	42
Gráfico 3-6. Remoción de pireno en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 48 h). (Error del 5 %)	43
Gráfico 3-7. Remoción de acenafteno en cultivos puros de P26 y H19, en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 72 h para ambas cepas, **tratamiento de 48 h para H19)	43
Gráfico 3-8. Remoción de fluoranteno en cultivos puros de P26 y H19, en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 72 h para ambas cepas, **tratamiento de 48 h para H19)	44
Gráfico 3-9. Remoción de pireno en cultivos puros de P26 y H19, en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 72 h para ambas cepas, **tratamiento de 48 h para H19)	44
Gráfico 3-10. Variación de la biomasa de P26 en el fluido circulante entre los días 1 y 8 del ensayo	47
Gráfico 3-11. Variación de la biomasa de H19 en el fluido circulante entre los días 2 y 6 del ensayo	48
Gráfico 3-12. Acenafteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26), b) tratamiento biológico (P26) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	49
Gráfico 3-13. Acenafteno removido luego de a) tratamiento biológico (H19), b) tratamiento biológico (H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	49
Gráfico 3-14. Fluoranteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26), b) tratamiento biológico (P26) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	50
Gráfico 3-15. Fluoranteno removido luego de a) tratamiento biológico (H19), b) tratamiento biológico (H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	50
Gráfico 3-16. Pireno removido luego de a) tratamiento biológico (P26), b) tratamiento biológico (P26) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	51
Gráfico 3-17. Pireno removido luego de a) tratamiento biológico (H19), b) tratamiento biológico (H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	51
Gráfico 3-18. Acenafteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26-H19), b) tratamiento biológico (P26-H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	52
Gráfico 3-19. Fluoranteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26-H19), b) tratamiento biológico (P26-H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	52
Gráfico 3-20. Pireno removido luego de a) tratamiento biológico (P26-H19), b) tratamiento biológico (P26-H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)	53
Gráfico 3-21. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en las muestras Control antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)	54
Gráfico 3-22. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestras con cultivos puros de P26 (tratamiento biológico) antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)	55

Gráfico 3-23. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestras con cultivos puros de H19 (tratamiento biológico) antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)....	55
Gráfico 3-24. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestras con co-cultivos P26-H19 (tratamiento biológico) antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)....	56
Gráfico 3-25. Concentración de petróleo en el suelo luego de la aplicación del tratamiento biológico (21 días) y químico. La concentración de petróleo adicionada/inicial fue de un 2 % (línea verde). (Las desviaciones estándar no superan el 5 %).....	58
Gráfico 3-26. Concentración de petróleo en el suelo luego de la aplicación del tratamiento biológico (33 días) y químico. La concentración de petróleo adicionada/inicial fue de un 2 % (línea verde). (Las desviaciones estándar no superan el 5 %).....	58

Listado de Figuras

Figura 1-1 Estructura molecular de diferentes hidrocarburos de petróleo (Shahsavari et al 2017).....	5
Figura 1-2. Un resumen de las tecnologías de biorremediación. Adaptado de Shahsavari et al 2017.....	10
Figura 1-3. Pasos en la formación del biofilm (Shukla et al 2014)	23
Figura 2-1. Esquema del flujo de circulación del agua de maceración de maíz hacia los reactores (P26 y/o H19) y finalmente al descarte.....	29
Figura 2-2. Esquema del flujo de circulación del fluido con hidrocarburos desde y hacia los reactores (P26 y/o H19).....	29
Figura 2-3. Estructura molecular de HAPs (Hussain et al 2018).....	30
Figura 2-4. Esquema del proceso de diluciones seriadas. (Adaptado de www.diversidadmicrobiana.com , Universidad de Granada, España).....	35
Figura 2-5. Método de siembra por extensión/diseminación en placa (Adaptado de www.depa.fquim.unam.mx , Universidad Nacional Autónoma de México).....	35

Listado de Fotos

Foto 1-1. Piletón antes y después de aplicado el landfarming. (Mendoza 2018).....	12
Foto 1-2. Biopila típica en construcción con cañerías de aireación vertical y horizontal para estimular la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados. (Mendoza 2018)	13
Foto 1-3. Dispositivo utilizado para la remediación de napa freática (Bioslurping) ubicada entre 1-5 m de profundidad y contaminada con gasolina que ocupó 13 hectáreas en el bajo de Añelo, Neuquén (Mendoza 2018).	14
Foto 2-1. Vista en detalle del reactor conteniendo el soporte de inmovilización (espuma de poliuretano).	31
Foto 2-2. Etapa de circulación del medio fresco (a la derecha de la foto) en el sistema.	31
Foto 2-3. Vista del sistema de circulación. Los reactores contienen biomasa inmovilizada de P26 (2 reactores) y H19 (2 reactores).....	32
Foto 2-4. Vista en detalle de frasco con la mezcla de hidrocarburos circulante en reactores con P26 inmovilizada.	32
Foto 2-5. Vista del sistema integrado por la bomba multicanal, frasco con mezcla de hidrocarburos y reactores con co-cultivo P26-H19 inmovilizado.....	33
Foto 2-6. Frascos de vidrio con suelo seco	37
Foto 2-7. Microcosmos-Situación control, atenuación natural	38
Foto 2-8. Microcosmos-Suelo inoculado con co-cultivo P26-H19	38
Foto 3-1. Cultivo bacteriano en placas de Petri. Las colonias de color anaranjado pertenecen a H19 y las blanquecinas a P26.....	47

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO Y SU PRESENCIA EN EL AMBIENTE

El mantenimiento y la preservación de los recursos naturales, que al mismo tiempo facilitan el desarrollo de las diversas actividades humanas, se han convertido en uno de los retos más importantes del siglo XXI. Esta gestión del medio ambiente, debidamente coordinada y complementaria del desarrollo social, la entendemos y definimos actualmente como sostenibilidad. Este nuevo y complejo concepto económico, social y ecológico en torno a las relaciones entre las sociedades y el medio ambiente se ha ido consolidando progresivamente como una demanda social imperativa. Al mismo tiempo, el gran desarrollo científico y tecnológico que se ha dado desde los años cincuenta del siglo pasado ha permitido el desarrollo de la biotecnología, que se define como el conjunto de innovaciones tecnológicas basadas en la utilización de microorganismos y procesos biológicos para el desarrollo de actividades científicas de investigación, encaminados a la obtención de bienes y servicios.

Entre las diferentes ramas de la biotecnología se encuentra la Biotecnología Ambiental que constituye la aplicación de la Biotecnología a la resolución de los problemas ambientales naturales y antrópicos y a la conservación de la calidad ambiental, proponiéndose conciliar el crecimiento económico con el tratamiento y reciclaje de los desechos de una manera sostenida y racional (Bermúdez Savón 2015).

En este marco, el suelo y el agua en su carácter de soportes de toda actividad humana, revisten especial importancia y requieren de todo el esfuerzo para asegurar su preservación. Las causas principales de contaminación de dichos componentes son: el uso irracional de pesticidas agrícolas no biodegradables y de fertilizantes minerales; las lluvias ácidas; los desechos urbanos e industriales que contienen metales pesados, grasas, detergentes, sales, microorganismos patógenos y compuestos derivados del petróleo (Informe del Estado del Ambiente, MAyDS, 2016).

Particularmente, la contaminación ambiental producida por el petróleo y sus derivados convoca especial interés ya que actualmente la sociedad depende fuertemente del mismo para la producción de energía y de materias primas para diversas actividades (Zhang *et al* 2008). En Argentina la producción de energía por hidrocarburos representa, desde hace décadas, más del 80 % de la matriz energética nacional, y está compuesta básicamente por el gas y el petróleo (y en mucha menor medida, el carbón).

La composición del petróleo crudo varía, pero en promedio se compone de parafinas, naftenos e hidrocarburos aromáticos. Las parafinas son hidrocarburos saturados lineales y ramificados mientras que los naftenos son hidrocarburos saturados cíclicos (Figura 1-1). No todos los hidrocarburos se biodegradan con la misma facilidad y no todos están disponibles para ser degradados, pero se estima una degradabilidad de entre el 70 y el 90% para diferentes crudos, siendo los remanentes principalmente asfaltenos y resinas.

La susceptibilidad de los componentes del petróleo crudo a la degradación ha sido descrita como sigue: alcanos > hidrocarburos aromáticos livianos (HAMS) > cicloalcanos > hidrocarburos aromáticos pesados (HAPs) > asfaltenos (Shahsavari *et al* 2017).

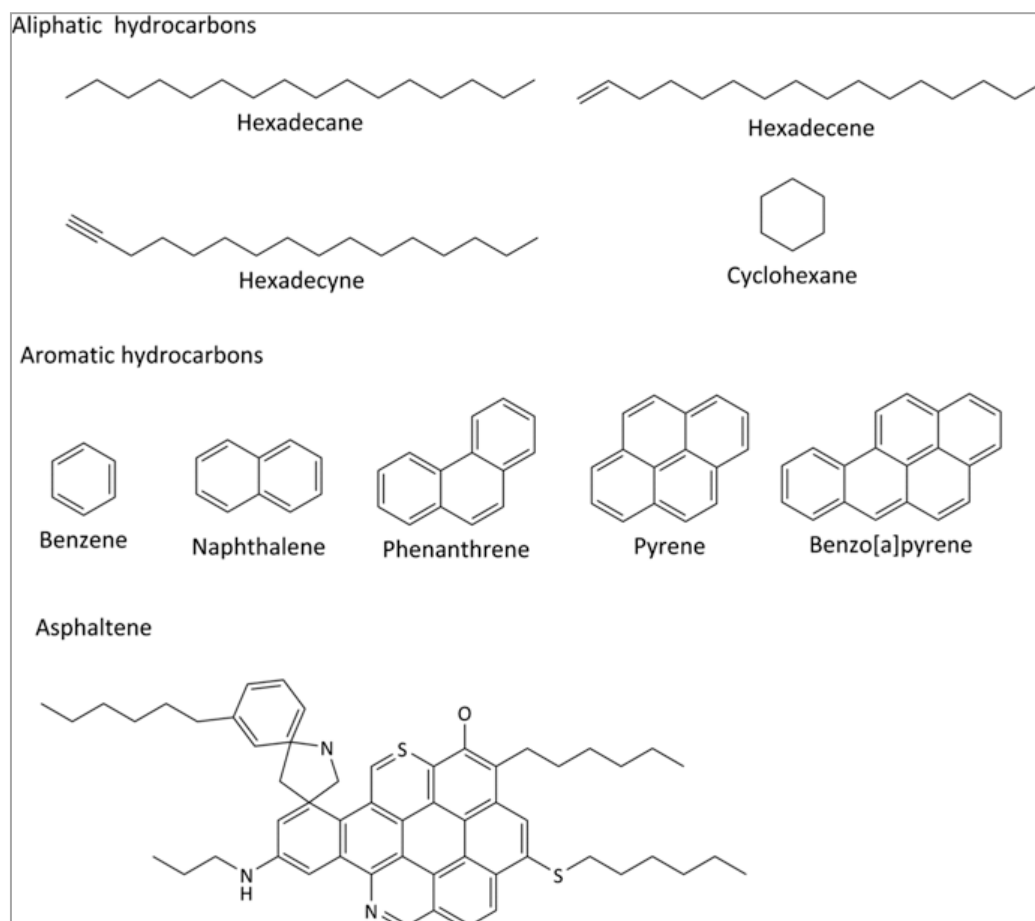


Figura 1-1 Estructura molecular de diferentes hidrocarburos de petróleo (Shahsavari *et al* 2017).

Los HAPs pueden contener uno o más anillos bencénicos y se clasifican como HAPs livianos o de bajo peso molecular, entre otros, al naftaleno (dos anillos), fenantreno (tres anillos) y antraceno (tres anillos), mientras que aquellos con cuatro o más anillos como el pireno (cuatro anillos), criseno (cuatro anillos), benzo[a]pireno (cinco anillos) y coronenos (siete anillos) se consideran HAPs pesados (Shahsavari *et al* 2017).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) comprenden del 10 al 25 % del petróleo crudo y se los considera muy peligrosos por su carácter carcinogénico, mutagénico y recalcitrante (Alessandrello, Tomás *et al* 2017). Se estima que entre 1,7 y 1,8 millones de toneladas métricas de petróleo crudo alcanzan el agua del planeta cada año y más del 90 % de esa cantidad está relacionada directamente a actividades humanas (Shahsavari *et al* 2017).

Estos compuestos están clasificados como contaminantes prioritarios por la mayoría de las agencias de protección ambiental del mundo por lo que su descarga en cuerpos receptores,

como cursos de agua y suelo, así como la restauración de ambientes degradados está regulada (Alessandrello, Parellada *et al* 2017). La biotecnología ambiental avanza como una alternativa eficiente para el cumplimiento de estas exigencias, lo que se evidencia, por ejemplo, en el desarrollo de un marco normativo en nuestro país que aborda la temática de la remediación y recomposición ambiental.

A nivel nacional, la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (actualmente con categoría de Ministerio) creó a través de la Resolución 515/06 (modificada por Res. 940/15) el Programa para la Gestión Ambiental de Sitios Contaminados – PROSICO. Los objetivos generales de este programa incluyen: a) identificar, sistematizar, calificar y cuantificar procesos de degradación por contaminación y b) definir las estrategias de prevención, control y recuperación de sitios contaminados, desarrollando conjuntamente el soporte regulatorio indispensable bajo el concepto de presupuesto mínimo de protección ambiental. Estos objetivos se perseguirán de manera conjunta y coordinada entre todas las jurisdicciones locales y el Estado Nacional.

La conducción del Programa está a cargo de la Dirección de Prevención y Recomposición Ambiental de la Dirección Nacional de Control Ambiental de la Subsecretaría de Control y Fiscalización Ambiental y Prevención de la Contaminación de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable.

Por otra parte, el PROSICO se constituyó como miembro cofundador de la Red Latinoamericana de Sitios Contaminados (RELASC¹), la que tiene como objetivo estimular la generación e intercambio de conocimientos en materia de gestión de áreas contaminadas a nivel latinoamericano.

En el ámbito de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, la Legislatura sancionó la Ley 6.117/18 (Decreto 22/19) de Gestión Ambiental de Sitios Contaminados. Esta Ley establece que la gestión de sitios contaminados debe abarcar de modo integral e interdependiente las etapas de: identificación de sitios actual o potencialmente contaminados, evaluación, diagnóstico, categorización, priorización, aplicación de medidas de contingencia y mitigación del daño, recomposición, monitoreo y compensación. La Subsecretaría de Políticas de Infraestructura Verde Urbana y Desarrollo Sostenible (Secretaría de Ambiente - CABA) es la autoridad de aplicación de esta Ley.

En la provincia de Buenos Aires, se destaca la siguiente normativa (página web-Sistema de Información Normativa):

- Resolución N° 18/96 - Secretaría de Política Ambiental (hoy OPDS-Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible). Identifica como tratamiento de residuos orgánicos por biodegradación al conjunto de técnicas, procedimientos de laboreo agrícola, inoculación de cepas y utilización de bioceldas y/o biorreactores, tendientes a producir la degradación, natural o asistida, y la síntesis de compuestos orgánicos por acción biológica. Los centros que apliquen este tipo de tratamiento

¹ <http://www.relasc.org/>

serán considerados, a los fines de su habilitación, establecimientos industriales de 3° Categoría, alcanzados por lo establecido en la Ley 11.459 (Radicación Industrial) y su Decreto Reglamentario. Así mismo, dichos establecimientos deberán cumplir con lo establecido por la Ley 11.720 (de Residuos Especiales) y su reglamentación.

- Resoluciones N° 446/99 y N° 664/00 - Secretaría de Política Ambiental. Establecen las condiciones técnicas-operativas bajo las cuales se regirá la metodología de tratamiento de Residuos Especiales y No Especiales conocida como "Tratamiento Biológico en el suelo: Landfarming".
- Resolución 335/08 – ADA (Autoridad del Agua). Aprueba la "Guía de requerimientos para la presentación de Estudio Hidrogeológico y Proyecto de Remediación" y los "Requisitos para la obtención del Permiso Precario de Emisión de Efluentes Líquidos producto de procesos de remediación de aguas subterráneas".
- Resolución N° 88/10 y modificatoria: Resolución N° 25/12- OPDS. Crea en el ámbito de la Dirección Provincial de Residuos el Programa de Control de Remediación, Pasivos y Riesgo Ambiental, que funcionará en la órbita de la Dirección de Residuos Especiales y Patogénicos.
- Ley N° 14.343/11. Regula la identificación de los pasivos ambientales, y obliga a recomponer sitios contaminados o áreas con riesgo para la salud de la población, con el propósito de mitigar los impactos negativos en el ambiente (contaminación del agua-suelo-aire). Crea el Registro de Pasivos Ambientales de la Provincia de Buenos Aires. Establece que toda persona física o jurídica, pública o privada, que realice actividades riesgosas para el ambiente, los ecosistemas y sus elementos constitutivos, deberá contratar un seguro de cobertura con entidad suficiente para garantizar el financiamiento de la recomposición del daño que en su tipo pudiere producir.
- Resolución N° 204/14 - Ministerio de la Producción, Ciencia y Tecnología. Crea el Programa de Fiscalización Portuaria que tendrá como objeto gestionar la fiscalización y control de la totalidad de las actividades y operaciones que se desarrollen en jurisdicción portuaria de la Provincia de Buenos Aires. Entre sus competencias está la de intervenir en la reparación y/o remediación de los pasivos ambientales generados en los espacios portuarios y ejecutar todas las atribuciones, deberes, derechos y responsabilidades correspondientes a la Ley N° 14.343 de pasivos ambientales.
- Resolución N° 94/14 – OPDS. Establece que toda tarea de extracción de sistemas de almacenaje subterráneo de hidrocarburos (SASH) o de sistemas aéreos de almacenaje de hidrocarburos (SAAH), incluyendo tanques, cañerías y accesorios, deberá efectuarse a través de un operador "in situ". Posteriormente a la extracción del S.A.S.H. y/o S.A.A.H. el Generador deberá presentar a la Autoridad de Aplicación una copia del estudio hidrogeológico a fin de evaluar la necesidad de realizar una remediación del sitio.

- Resolución N° 95/14 - OPDS. Establece las pautas que regirán para el inicio, ejecución y finalización de tareas de remediación en sitios contaminados ubicados en el territorio de la provincia de Buenos Aires. El Anexo I describe las pautas técnicas de contenidos mínimos para la elaboración del Estudio de Caracterización de Sitios Contaminados y el Anexo III, las pautas técnicas a considerar para el Plan de Remediación. El Plan de Remediación deberá ejecutarse por una empresa remediadora con la tecnología seleccionada debidamente inscripta en el Registro Provincial de Tecnologías, conforme la Ley N° 11.720 (Residuos Especiales).

Por otra parte, el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM) establece un gran número de normas referentes a la Calidad del Suelo (Serie 29400 y 29500) y la Calidad del Agua (Series 29000 y 29100) en lo que concierne al muestreo, protección, tratamiento y rehabilitación de estos componentes (página web-IRAM). Por citar un ejemplo, la Norma IRAM 29555-1:2003 establece condiciones fisicoquímicas y biológicas para el desarrollo de una técnica remediadora (Pozzo Ardizzi 2018).

Es para resaltar que la remediación ambiental se encuentra entre los temas estratégicos del Plan Argentina Innovadora 2020, instrumento a través del cual el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (MINCYT) establece los lineamientos de política científica, tecnológica y de innovación en el país hasta el año 2020 (Plan Argentina Innovadora 2020, MINCYT 2011). Actualmente el MINCYT se propone marcar una continuidad con esta labor de planificación de las políticas públicas en ciencia, tecnología e innovación (CTI), corriendo su horizonte al 2030 (Argentina Innovadora 2030), con miras a un impacto creciente de la CTI en la agenda del desarrollo productivo y social (Argentina Innovadora 2030, página web del MINCYT).

1.2 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS: BIORREMEDIACIÓN

En la actualidad existe un amplio espectro de tecnologías aplicables para el tratamiento de sitios contaminados con petróleo. Entre ellas, los tratamientos biológicos han mostrado ser promisorios y económicamente viables basándose en la capacidad de los microorganismos heterótrofos de usar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Chen *et al* 2017). Dichos tratamientos se engloban en el concepto de *biorremediación*: uso de organismos vivos (principalmente microorganismos: bacterias, hongos o plantas) para degradar o transformar los contaminantes ambientales en formas menos tóxicas. Estos microorganismos pueden ser nativos del área contaminada o pueden ser aislados de cualquier otro ambiente e inoculados al sitio de interés.

Los microorganismos biorremediadores, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen la capacidad de utilizar diferentes compuestos tóxicos (xenobióticos) como fuente de carbono, sin embargo, su densidad poblacional es limitada en sitios no contaminados y se incrementa en ambientes impactados por un contaminante. Entre los organismos vivos que se utilizan en las tecnologías de biorremediación, las bacterias representan el grupo microbiano más activo por su variedad de géneros y especies y por la versatilidad metabólica que poseen. Las poblaciones mixtas, denominadas consorcios o

cohortes microbianas, demuestran mayor acción biodegradadora por sus actividades especializadas y por la acción cooperativa de la población mixta. Los géneros bacterianos degradadores de xenobióticos más comunes tanto en suelos como en aguas son: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas* spp. (Pozzo Ardizzi 2018).

Las pseudomonas (Phylum Proteobacteria) son bacterias Gram negativas, con metabolismo aeróbico estricto. Actualmente el género incluye unas 160 especies de una gran diversidad ecológica; es genotípica, fenotípica y fisiológicamente heterogéneo. La conocida resistencia a altas concentraciones de sales, desinfectantes, antibióticos y un gran número de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el ambiente se sustenta en la coexistencia natural de la diversidad de especies (Vojtková *et al* 2015).

Estas bacterias tienen unos requisitos nutricionales muy sencillos y crecen quimiorganotróficamente a pH neutro y a temperaturas en el rango de los mesófilos (temperaturas óptimas moderadas). Una de las características más llamativas es su capacidad para usar numerosos compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Algunas especies utilizan más de 100 compuestos diferentes y solo unas pocas especies pueden utilizar menos de 20.

Son organismos ecológicamente importantes tanto en el agua como en los suelos y son probablemente responsables de la degradación de numerosos compuestos solubles derivados del material vegetal y animal en hábitats aerobios. También son capaces de degradar numerosos compuestos xenobióticos (de origen sintético) como pesticidas y otros productos químicos tóxicos y son por tanto importantes agentes medioambientales de biorremediación (Madigan *et al* 2009).

Se ha señalado la tolerancia de las pseudomonas a una mayor concentración de solventes orgánicos y compuestos aromáticos en comparación con otras bacterias, como es el caso de *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y especialmente *P. putida* que fue aislada de sedimentos, de quien también se ha verificado su excelente capacidad de utilizar concentraciones más elevadas de compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía (Vojtková *et al* 2015).

Los miembros del género *Gordonia* (Phylum Actinobacteria) son organismos aeróbicos, gram positivos a gram variables. La mayor parte de las especies del género *Gordonia* han sido aisladas del medio ambiente, solo unas pocas han sido encontradas asociadas con infecciones humanas. Casi todos estos casos correspondieron a pacientes inmunosuprimidos con infecciones de *Gordonia* ocurridas secundariamente en relación a patologías subyacentes.

Las especies de este género son sólidos candidatos para procesos de biorremediación debido a su capacidad para degradar hidrocarburos sustituidos y no sustituidos, contaminantes ambientales ampliamente distribuidos y compuestos naturales no fácilmente biodegradables. Pueden jugar un rol importante en el tratamiento de efluentes líquidos y en biofiltros y han sido aisladas debido a su capacidad de degradar o modificar hidrocarburos aromáticos y alifáticos, compuestos aromáticos halogenados, benzotiofeno, nitrilo, poliisopreno, xileno, etc. (Arenskotter *et al* 2004).

Las estrategias de biorremediación pueden ser pasivas, como en el caso de la atenuación natural donde se monitorea la degradación natural del contaminante por parte de la microbiota nativa, o dirigidas, que incluyen: 1) bioestimulación: consiste en mejorar las condiciones ambientales del sitio impactado para favorecer el crecimiento microbiano a través de la adición de nutrientes, oxígeno y agua; 2) bioaumentación: se basa en la inoculación de microorganismos degradadores en el sistema con el fin de aumentar las capacidades metabólicas de la comunidad indígena para incrementar la degradación del contaminante (Vidali 2001).

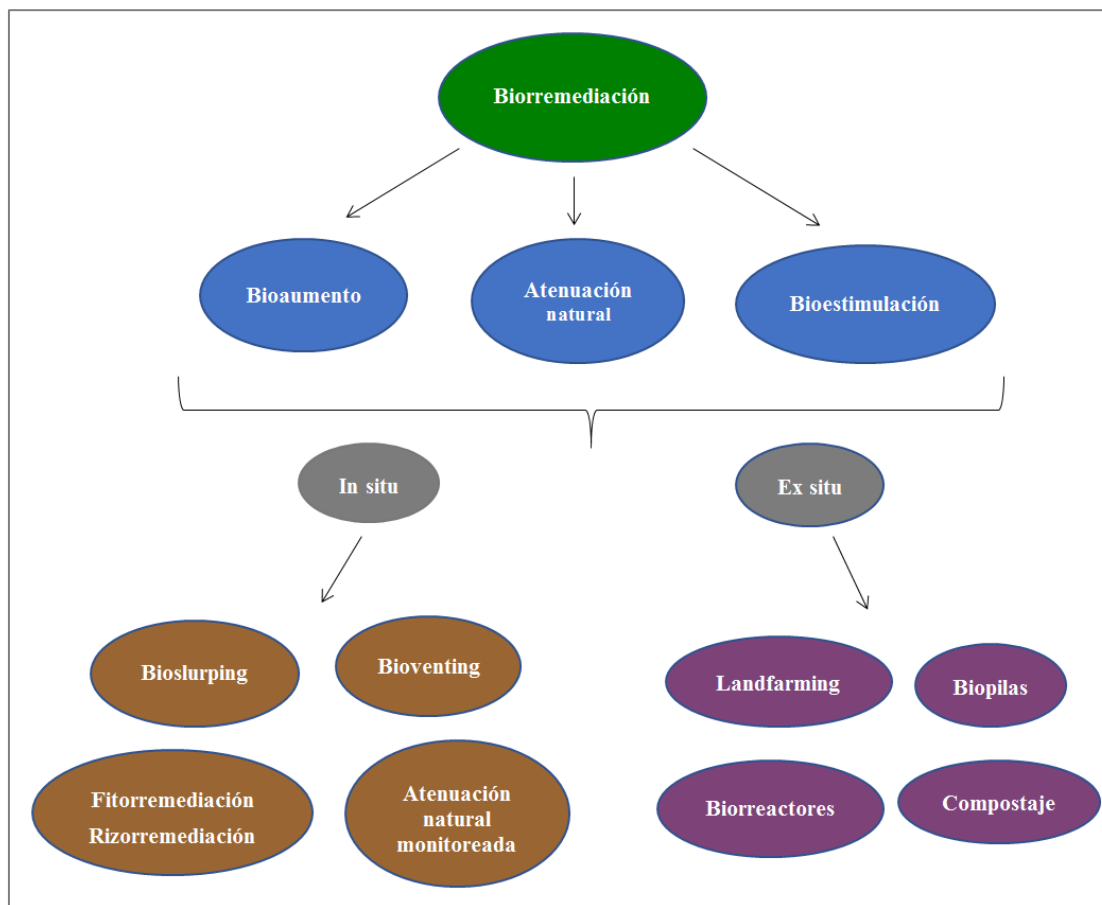


Figura 1-2. Un resumen de las tecnologías de biorremediación. Adaptado de Shahsavari et al 2017

1.2.1 Métodos de biorremediación

Existen numerosos métodos de biorremediación disponibles que van desde simples a complejos, de bajo costo y alto costo, y pueden aplicarse *in situ* o *ex situ*. Cualquiera sea la técnica utilizada para remediar, sanear, rehabilitar o biorremediar un sitio contaminado cuando se trata de grandes superficies o volúmenes contaminantes debería cumplir al menos con 2 principios básicos para que sea efectiva: ser económica y ecológicamente sustentable, de otro modo existen grandes posibilidades de fracaso durante el desarrollo del

tratamiento, y que este se abandone o no se concrete por completo. Algunas de las más utilizadas por su costo y efectividad son las siguientes (Mendoza 2018):

1.- Atenuación natural: estrictamente y en situaciones reales y prácticas se trata de un método que se realiza en el lugar donde se produjo la contaminación (in situ), generalmente por derrames accidentales, siempre y cuando las condiciones del ambiente y la magnitud y calidad de la contaminación lo permitan. Si el volumen de petróleo derramado y concentración final de hidrocarburos en el sitio contaminado son muy elevadas, es posible que sea necesario emplear otro método de biorremediación.

La atenuación natural aprovecha procesos naturales para contener la contaminación causada por derrames de petróleo y reducir su concentración, por ejemplo, en el suelo afectado. Se procede en primer lugar a un aislamiento del sitio contaminado y se monitorea en el tiempo la marcha de la biorremediación natural o también llamada remediación pasiva.

Este proceso depende de las características y capacidad del suelo para degradar hidrocarburos asociadas con el clima del lugar. En todos los casos de derrame es muy importante en principio realizar tareas de recuperación del petróleo derramado en la superficie del suelo al máximo posible, tanto de aquel acumulado en concavidades naturales como el existente en pozos de recuperación realizados para tal fin por medio de bombeo. Esta tarea es muy importante y necesaria como parte del saneamiento del lugar contaminado y también para disminuir las concentraciones de hidrocarburos en suelo a niveles apropiados y permitir una degradación efectiva en el menor tiempo posible. Esta tarea es necesaria, además, para preservar la vegetación del lugar y evitar la remoción del horizonte superficial del suelo donde se encuentran la mayor parte de los nutrientes, materia orgánica y microorganismos de suelo que sustentan la fertilidad para el crecimiento vegetal.

Posteriormente durante el transcurso de la biorremediación, el aumento de la cobertura y crecimiento vegetal contribuirán a acelerar la remediación del sitio contaminado. En todos los casos es importante también no “planchar” el suelo, por el contrario, dejarlo de manera rugosa para mejorar la aireación, retener humedad y aumentar la captación y deposición de semillas arrastradas por el viento e inclusive realizar surcos de poca profundidad y acelerar aún más la biorremediación por aumento de la cobertura vegetal del terreno.

De todas maneras, transcurrido un tiempo de estabilización del sistema es posible realizar algunas labores que estimulen la degradación de hidrocarburos tales como, mezclar los primeros centímetros del horizonte superficial contaminado, agregar nutrientes, estimular el crecimiento de plantas, etc. En este caso dejaría de ser atenuación natural estrictamente para pasar a denominarse como algunos de los casos que se mencionan a continuación.

En cuanto al tratamiento de aguas contaminadas, la eficacia de la biorremediación de aguas subterráneas *in situ* ha sido atribuida, en gran número de reportes, a la atenuación natural, sea o no monitoreada (Shahsavari *et al* 2017).

2.- Landfarming: puede realizarse en el lugar de contaminación o trasladar el suelo contaminado con una alta concentración de hidrocarburos a otro sitio para biorremediar. Se trata de disponer el residuo hidrocarbonado sobre la superficie del suelo y mezclarlo con una capa de este de manera apropiada para diluirlo hasta una profundidad variable como para obtener niveles de hidrocarburos de hasta 5-7 % en peso y utilizar el suelo como

biorreactor. La capa de suelo debe ser la mínima posible para alcanzar las concentraciones de hidrocarburos deseadas. Esta técnica fue utilizada por ejemplo para el vaciado, tapado y saneamiento de piletones compuestos por residuos de petróleo y agua salina en Pico Truncado, Santa Cruz, Argentina (Foto 1-1).



Foto 1-1. Piletón antes y después de aplicado el landfarming. (Mendoza 2018).

3.- Biopilas: es una técnica asistida y muy utilizada que se realiza en otro lugar (*ex situ*) donde el suelo fue contaminado y destinado para tal fin. La elección del lugar destinado para establecer las biopilas debe tener un perfil de suelo con la napa freática ubicada a una cierta profundidad, además de asegurarse de que el perfil de suelo sea impermeable o impermeabilizarlo para evitar que componentes móviles del petróleo puedan alcanzar y contaminar la napa. La biopila es básicamente un sistema de composteo y consiste en mezclar los residuos de hidrocarburos con suelo a concentraciones que pueden ser mayores que para landfarming, pero adecuadas para manejo del suelo y no tan altas como para disminuir de manera marcada la tasa de degradación de hidrocarburos.

Previo a la construcción de la biopila, y si fuera necesario por el tipo y tamaño del material contaminado, se debe realizar una homogenización del suelo utilizando una zaranda para disminuir el tamaño del grano y aumentar así la exposición del contaminante a la acción de los microorganismos degradadores de hidrocarburos. Además, el tamizado permite homogeneizar el muestreo posterior y disminuir la variabilidad en el análisis de hidrocarburos durante el monitoreo de la degradación en el tiempo. La biopila tiene forma trapezoidal y las dimensiones variarán entre un largo de 10 a 100 m, un ancho 5 a 20 m y 2 a 4 m de altura (Foto 1-2).

La pila construida puede ser tapada para conservar la humedad y temperatura, y también aireada por cañerías por circulación forzada o natural y humedecerla con riego si fuera necesario y conveniente. En muchos casos, se realiza el volteo y mezcla de la pila para aireación y homogenización, y también la incorporación de bacterias alóctonas degradadoras de hidrocarburos.

En caso de que el clima y el suelo no proporcionen condiciones apropiadas como para promover el crecimiento bacteriano, y de esta manera lograr una eficiente degradación de

hidrocarburos en el menor tiempo posible, será necesario corregirlas mediante bioestimulación y bioaumentación.

El suelo contaminado con petróleo contiene generalmente una concentración de hidrocarburos totales superior al 1 % p/p como suelo seco, que es el nivel guía superior indicado como punto final para biorremediación según la legislación vigente. Los hidrocarburos halogenados, si se encuentran, no deben superar concentraciones de 5 %, pero si fuera superior, sería necesaria aplicar una oxidación previa al tratamiento en biopila hasta alcanzar un nivel inferior al 5 %.



Foto 1-2. Biopila típica en construcción con cañerías de aireación vertical y horizontal para estimular la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados. (Mendoza 2018)

4.- Bioaumentación: consiste en la siembra de microorganismos degradadores de hidrocarburos en un suelo contaminado, que fueron crecidos y multiplicados previamente en medios apropiados. Las bacterias degradadoras pueden ser bacterias alóctonas de origen comercial y las autóctonas previamente multiplicadas. Es una técnica complementaria que puede combinarse con otras y acelerar de este modo la tasa de degradación de hidrocarburos en suelo, especialmente cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o en capacidad degradadora.

5.- Bioestimulación: es también una técnica complementaria de biorremediación denominada biorremediación asistida, que consiste en mejorar las condiciones de humedad, temperatura, fertilidad del suelo y aireado para estimular a la población microbiana autóctona y así acelerar la tasa de degradación de hidrocarburos. En todos estos casos es muy importante realizar un monitoreo del sistema y las mediciones necesarias para corregir y acelerar así la tasa de degradación de hidrocarburos a su máximo posible mediante el ajuste de las variables involucradas. Estas variables deben estar asociadas a las condiciones de suelo y clima del lugar pues existe interacción positiva entre las variables que

bioestimulan el sistema, y la combinación de más de una variable aumenta la tasa de degradación de hidrocarburos.

6.- Remediación de napa (bioslurping): es la típica tecnología utilizada para la biorremediación de napa freática. En este tratamiento se utilizan una serie de cañerías distribuidas y enterradas a profundidades apropiadas para permitir la succión del agua contaminada con hidrocarburos de la franja capilar y del nivel freático (Foto 1-3). La técnica también permite insuflar aire (bioventing) para acelerar la biorremediación. El agua contaminada se separa del hidrocarburo para luego gestionarlos de manera conveniente, previo paso por un filtro biológico.



Foto 1-3. Dispositivo utilizado para la remediación de napa freática (Bioslurping) ubicada entre 1-5 m de profundidad y contaminada con gasolina que ocupó 13 hectáreas en el bajo de Añelo, Neuquén (Mendoza 2018).

7.- Fitorremediación: es el empleo de organismos vegetales como árboles, arbustos, pasturas y plantas acuáticas, para remover, degradar, transformar o secuestrar sustancias contaminantes del medioambiente terrestre o acuático. Se trata de una tecnología de bajo costo y ecológicamente compatible con criterios de sustentabilidad. Las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras para depurar suelos y aguas contaminadas con un costo muy inferior a los métodos tradicionales. Algunos de los procesos degradativos en la fitorremediación ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos, pero mejor aún en el caso de la combinación planta-microorganismo.

La fitorremediación es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas en plazos largos y por sobre todo, es una metodología con plena aceptación pública y gubernamental. Si bien los períodos pueden ser largos e inefectivos a profundidades donde la masa de raíces en suelo es escasa, una mayor cobertura vegetal de la superficie en el suelo contaminado acelera, directa o indirectamente, la degradación de hidrocarburos. Las plantas a través de la actividad de su rizósfera

estimulan el crecimiento en número de bacterias capaces de degradar hidrocarburos en el suelo.

La fitorremediación incluye a plantas asociadas con comunidades microbianas y ofrece métodos de remediación con mínimos disturbios del ecosistema en reparación. Las especies vegetales con potencial para ser utilizadas en fitorremediación se estiman alrededor de 750. Algunas de las propiedades deseables que debería reunir una especie para ser utilizada en biorremediación serían las siguientes:

1. Tolerancia a salinidad y pH alto.
2. Tolerancia a sequía e inundación variable y prolongada.
3. Buena masa de raíces con alcances profundos.
4. Tolerancia y adaptación al contaminante y al sitio contaminado.
5. Alta capacidad de acumular y concentrar el contaminante en sus tejidos cosechables.

8 – Biorreactores (*ex situ*): Esta técnica consiste en el tratamiento de la matriz contaminada en biorreactores controlados, como por ejemplo los reactores secuenciales en *batch*. Durante el tratamiento se adicionan nutrientes para incrementar la actividad degradadora de los microorganismos. El reactor incluye en su diseño varios procesos de control para permitir el monitoreo y manipulación de la temperatura, la adición y mezcla de nutrientes, con el fin de lograr una máxima eficiencia de remoción. Otras ventajas son un mejor control de emisiones y menores requerimientos de espacio.

Entre las limitaciones se encuentran los mayores tiempos de tratamiento, muchas veces la necesidad de un pretratamiento, materiales requeridos que se dispersan fácilmente en agua y un requerido control de volatilizaciones (Ossai *et al* 2020). Se han utilizado exitosamente biorreactores para optimizar el crecimiento y actividad de la población microbiana para remediar aguas contaminadas. Esta estrategia *ex situ* involucra el bombeo de agua subterránea contaminada para su biotratamiento, seguido de una inyección del agua tratada en el sitio impactado (Shahsavari *et al* 2017).

1.2.2 Biorremediación en Argentina

1.2.2.1 Interacción entre las partes involucradas

La gestión de matrices contaminadas con hidrocarburos en nuestro país involucra al menos a cinco partes (Mendoza 2018):

1.- *Gobiernos*: nacional, provincial y municipal. Existe una superposición de jurisdicciones, de legislación a aplicar, y de criterios para aplicarla. Normalmente, las provincias adhieren a la ley nacional con la normativa provincial y en algunos casos pueden agregar modificaciones. Las empresas normalmente se ajustan a la ley provincial y en algunos casos el municipio exige cumplimientos adicionales.

2.- *Empresas pasibles de generar contaminación*: las empresas necesitan medidas claras, concretas y factibles de realizar. Estas medidas resultan de leyes, normativas y resoluciones, sin embargo, existe en ocasiones una baja factibilidad para su cumplimiento. Las empresas procuran cumplir con las reglas, mejorar su imagen ante la comunidad, resolver los llamados pasivos ambientales y trabajar mancomunados con las autoridades gubernamentales. Son dependientes de sus políticas internas y del grado de compromiso con el medioambiente que varía ampliamente entre empresas.

Una de las dificultades que enfrentan es el transporte interprovincial de contaminantes que se encuentra impedido por ley. Otro punto es la falta de laboratorios cercanos a los yacimientos en donde se puedan realizar análisis de contaminantes y tratamiento de residuos peligrosos, para evitar dicho transporte interjurisdiccional. Estos y otros impedimentos requieren reglas claras, concretas y factibles, pero persistentes en el tiempo, que aseguren como resultado permanentes inversiones.

3.- *Profesionales*: el abordaje de la temática apunta a una actividad multidisciplinaria que involucre a geólogos, químicos, microbiólogos, ingenieros agrónomos, técnicos de petróleo, profesionales ambientales, entre otros. No todas las empresas pueden acceder o acceden a todos los profesionales requeridos, de esta manera los trabajos de biorremediación sufren de limitaciones de acuerdo al profesional que los lleve adelante, la política de la empresa y los controles que puedan ejercer los gobiernos involucrados. Actualmente existen empresas privadas que realizan trabajos de biorremediación y los trabajos son generalmente tercerizados por las empresas petroleras.

4.- *Propietario*: es el empresario o productor, superficiario en la jerga petrolera, al que se le ha contaminado el terreno y reclama por indemnizaciones debido al uso de su superficie, tránsito vehicular y pasivos ambientales. Las indemnizaciones se pagan anualmente, y cuando la rentabilidad de la actividad del propietario es baja, estas indemnizaciones juegan un papel muy importante a modo de un “clásico subsidio agropecuario” que en muchos casos supera los niveles de rentabilidad de la propia actividad agropecuaria y resulta tentadora cuando se debe tomar la decisión de producir o recibir la indemnización.

5.- *Comunidad animal y vegetal*: es el objetivo de protección contra la contaminación. Existen organizaciones políticas de segundo y tercer orden, ecologistas, académicas y científicas que trabajan intensamente por la prevención de la contaminación del aire, suelo y agua. Todas ellas han contribuido en gran medida al avance en los trabajos de biorremediación realizados en Argentina en los últimos 20 años.

Algunos problemas para la instrumentación de las normativas, reglamentaciones y leyes desde el punto de vista técnico-científico son las siguientes:

1.- Se definen valores totales de concentración de contaminante basados en estimaciones de riesgo, sin tener en cuenta la capacidad amortiguadora de los suelos para el contaminante en cuestión.

2.- Al definir concentración total, no se define la carga máxima de ese contaminante en el tiempo.

3.- El transporte interjurisdiccional de residuos peligrosos está prohibido por ley y, al mismo tiempo, existen pocos laboratorios especializados y menos aún certificados que puedan monitorear la contaminación de acuerdo a las exigencias de la normativa vigente.

4.- La definición de residuo peligroso es demasiado amplia.

5.- El efecto climático no está considerado, de manera tal que una contaminación en Salta donde las precipitaciones alcanzan alrededor de 1000 mm anuales, pero concentrado en un corto período, tiene igual tratamiento legal que la misma contaminación en Neuquén donde llueven 160 mm y distribuidos en todo el año.

1.2.2.2 Líneas de investigación

Las siguientes son algunas de las instituciones que en nuestro país llevan adelante proyectos de investigación e iniciativas que abordan la temática de la biorremediación (actualizado de Di Paola y Vicién 2010):

Institución	Proyectos y Líneas de Investigación
Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos: PROIMI – CONICET TUCUMÁN.	Biología Ambiental y Biorremediación: Biodegradación de hidrocarburos, plaguicidas, remoción y resistencia a metales pesados, fitorremediación, biodecoloración.
Laboratorio de Bioprocesos – Facultad de Ingeniería – Universidad Nacional de Cuyo.	Estudio de la biodegradabilidad de las fracciones recalcitrantes de hidrocarburo en Biopilas. Año 2013-2015. Estudio de alternativas técnicas para el tratamiento de residuos empetrolados generados en la actividad petrolera. Año 2013-2015. Diseño y desarrollo de sistema móvil de tratamiento de residuos empetrolados. Proyecto realizado bajo el Programa FONARSEC. Año 2015-2017
Universidad Nacional del Chaco Austral	Estudio de las propiedades físico - químicas del biogás generado por biodegradación de residuos efluentes industriales
CINDEFI. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UNLP	Biominería y biorremediación de metales pesados. Relevamiento de pasivos ambientales Enzimas microbianas de interés biotecnológico. Producción de enzimas recombinantes Biodegradación microbiana de hidrocarburos. Biofilms bacterianos. Interacciones planta-bacteria

Institución	Proyectos y Líneas de Investigación
Universidad Nacional de Tucumán – Facultad de Bioquímica / PROIMI	<p>Biotecnología fúngica: hongos filamentosos o levaduras. Biorremediación de sitios contaminados con metales pesados y biodecoloración de efluentes agroindustriales, biodecoloración de colorantes textiles reactivos.</p> <p>Biotecnología de actinobacterias y otros tipos de bacterias, tanto Gram negativas, como Gram positivas. Biorremediación de sitios contaminados con metales pesados e hidrocarburos. Biorremediación y fitorremediación de sitios contaminados con plaguicidas organoclorados y organofosforados.</p>
Universidad Nacional de San Martín – 3iA-Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental	<p>Biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados mediante tecnologías bio-electroquímicas</p> <p>Reciclado y Valoración Energética de Residuos Industriales (RYVERI)</p> <p>Procesos de Oxidación Avanzada aplicados a la remediación de afluentes líquidos o gaseosos; Química sol-gel y sus aplicaciones a la síntesis de fotocatalizadores, membranas, emulsiones e hidrogeles.</p> <p>Remediación de efluentes y generación de hidrocarburos a partir de microalgas de agua dulce.</p>
Universidad Nacional de Quilmes – Departamento de Ciencia y Tecnología	<p>Enzimas microbianas para la revalorización y/o remediación de residuos agroindustriales.</p>
NANOBIOTEC- Instituto de Nanobiotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA	<p>Aprovechamiento del potencial biotecnológico de los microorganismos de los ambientes de clima frío extremo, principalmente la Antártida. Diseño y optimización de procesos de biorremediación que involucren bioestimulación y bioaumentación.</p> <p>Capacidad de producción por parte de los microorganismos psicrófilos antárticos, de metabolitos con potencial biotecnológico.</p> <p>Uso de la fito/rizorremediación, para mitigar el impacto sobre la salud y el medio ambiente producto del uso de agroquímicos en agro-ecosistemas.</p>
IBBEA-Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA	<p>Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.</p>

Institución	Proyectos y Líneas de Investigación
Universidad Nacional de Cuyo – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales	Escalamiento industrial a nivel piloto de un sistema biorremediador de suelos y aguas contaminados con metales pesados y radioisótopos, compuesto por <i>Senecio bonariensis</i> , <i>Rhizophagus intraradices</i> , un cofactor metálico enzimático y cenizas volcánicas.
Instituto de ecología y ambiente humano, Consejo de investigación, Universidad Nacional de Salta	Fitorremediación de suelos contaminados, capacidad de especies nativas en la remediación de suelos contaminados. Actualmente, dada la problemática local, los estudios se centran en contaminación con Boro y con petróleo y sus derivados.
Laboratorio de Microbiología Ambiental - Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET), ciudad de Puerto Madryn, Provincia del Chubut,	Aspectos genéticos y ecológicos de la biodegradación de hidrocarburos en ambientes marinos de la Patagonia: -Identificación y cuantificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos -Metagenómica y biotecnología -Metagenómica y biodegradación de hidrocarburos
YPF LUZ	Biotratamiento de Efluentes Líquidos en Vaca Muerta. Proyecto Forestal Central Térmica Loma Campana

En el Laboratorio de Microbiología Ambiental (PROIMI) y bajo la dirección de la Dra. Ferrero, se han caracterizado poblaciones bacterianas capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) utilizando métodos dependientes e independientes del cultivo (Vázquez *et al* 2013). Estas poblaciones fueron enriquecidas a partir de sedimentos marinos costeros de la Patagonia argentina, expuestos a distintos niveles de impacto antropogénico (Potencial de Biorremediación Intrínseca de HAPs en Sedimentos Marinos de la Costa Patagónica. Subproyecto B-C-28, Proyecto No. ARG/02/018 del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD)). Algunos de los aislamientos están siendo utilizados en ensayos de biodegradación de HAPs en cultivos puros y mixtos, para un potencial uso en protocolos de biorremediación (Isaac *et al* 2013, Bourguignon *et al* 2014).

Actualmente, hay ensayos conducentes a la utilización de cultivos bacterianos mixtos para la degradación de HAPs como estrategia para expandir el rango de sustrato para la remoción de compuestos aromáticos, en estado plantónico y en biofilms o sistemas de inmovilización en soportes inertes (Parellada *et al* 2011., Parellada *et al* 2013). Las actividades aditivas o sinérgicas demostradas en estos cultivos mixtos comprueban la existencia de interesantes interacciones entre los miembros de los consorcios bacterianos que podrían derivar en una potencial alternativa para procesos de biorremediación *ex situ*

de aguas residuales provenientes de refinerías de petróleo (Gentili *et al* 2006, Isaac *et al* 2015).

1.3 TRATAMIENTOS DE REMEDIACIÓN QUÍMICA

Los métodos de remediación química incluyen tecnologías que utilizan sustancias químicas para contener, secuestrar, precipitar, concentrar, separar y remover contaminantes de suelos, aguas superficiales y subterráneas. A continuación, se describen las principales técnicas aplicadas (Ossai *et al* 2020):

1 - Solidificación/estabilización (*in situ* y *ex situ*): Esta técnica apunta a restringir la migración o movilidad de los contaminantes a través de procesos físicos o químicos. Estos procesos incluyen precipitación, formación de complejos y adsorción. Entre los agentes más comúnmente utilizados para la solidificación y estabilización están el cemento portland, silicatos, fosfatos y yeso.

2 – Inmovilización (*in situ* y *ex situ*): Este método incrementa el proceso de sorción en el suelo a través del uso de químicos como el fosfato diamónico para reducir la solubilidad y movilidad del contaminante en el suelo, la solubilidad de los metales y la fito-disponibilidad.

3 – Dispersión (*in situ*): La dispersión implica la desintegración de “mareas negras” de petróleo en numerosas gotas a través de la aplicación de dispersantes químicos que disminuyen la tensión superficial en la interfase agua-petróleo, permitiendo la subsecuente degradación por parte de microbiota nativa. La biodegradabilidad de estos dispersantes es crucial, de otro modo, estos podrían acumularse en el ambiente y causar un daño adicional. La eficiencia de los biosurfactantes (compuestos tensioactivos producidos por microorganismos) ha sido probada en la remoción de petróleo en el conocido desastre del Exxon Valdez, buque naufragado en Alaska en 1989.

4 - Oxidación química: Las técnicas de oxidación química se basan en la adición de oxidantes fuertes para producir la degradación de contaminantes recalcitrantes, presentes en aguas o suelos.

Entre los oxidantes más utilizados se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión permanganato (MnO_4^-) y el anión persulfato ($S_2O_8^{2-}$). Estos oxidantes pueden transformar los contaminantes orgánicos en productos menos peligrosos y en algunos casos llegar hasta su degradación total generando H_2O y CO_2 (Medina *et al* 2014).

En función del lugar donde se aplican, se pueden distinguir dos tipos de tecnologías: *in situ* o *ex situ*. Las primeras se realizan en la zona contaminada, requieren de un flujo de aire o agua a través del suelo para hacer llegar el agente descontaminante a la zona contaminada, por lo que son utilizados en suelos con buenas condiciones de permeabilidad. Permiten que se utilice el espacio durante la recuperación, pero son difíciles de llevar a la práctica por la dificultad que resulta de poner en contacto el agente oxidante con toda la masa de suelo contaminada. Las tecnologías *ex situ* se realizan extrayendo el suelo del terreno para tratarlo. Pueden clasificarse en tecnologías: (i) *on site*, que tratan el suelo en la misma zona,

u (ii) *off site*, que llevan el suelo extraído a una planta para su tratamiento. Tienen gran eficacia y rapidez, pero suelen ser más costosas (Peluffo 2016).

La oxidación química depende del contacto entre los contaminantes y los oxidantes. El empleo de este método requiere una caracterización cuidadosa del sitio impactado para determinar sus propiedades fisicoquímicas como la materia orgánica, masa del contaminante, demanda química de oxígeno (DQO), oxígeno disuelto, pH, conductividad hidráulica, potencial de óxido-reducción, etc. Heterogeneidades en la permeabilidad del suelo, por ejemplo, pueden resultar en la formación de áreas con contaminantes no tratados y los oxidantes pueden ser consumidos por la materia orgánica del suelo y metales disueltos en lugar de por los contaminantes, resultando en un tratamiento no efectivo.

5 – Deshalogenación: Este es un proceso de remediación que involucra la adición de reactivos al suelo, agua superficial o subterránea contaminados con compuestos orgánicos halogenados. La deshalogenación se logra a través del reemplazo de las moléculas halogenadas (cloro, bromo, yodo) por un átomo de hidrógeno produciendo la descomposición y volatilización parcial de los contaminantes. Este proceso se aplica para el tratamiento de residuos con Bifenilos Policlorados (PCBs), entre otros.

6 - Oxidación ultravioleta: Este es un proceso de oxidación avanzada que emplea la radiación ultravioleta o luz UV y oxidantes químicos como el ozono (O_3) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para degradar y mineralizar contaminantes orgánicos y compuestos recalcitrantes en agua subterránea contaminada con compuestos orgánicos volátiles (VOCs) e hidrocarburos de petróleo. La luz ultravioleta de alta intensidad combinada con el peróxido de hidrógeno se usa para oxidar contaminantes obteniéndose agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2) y sal inorgánica.

7 – Tratamiento con carbón activado: Involucra la adsorción de contaminantes orgánicos en la superficie de un filtro de carbón activado en aguas superficiales, subterráneas, líquidos residuales y suelo. Esta técnica reduce la biodisponibilidad de ciertos contaminantes orgánicos debido a sus fuertes propiedades de sorción, hidrofobicidad y estructura microporosa, y su eficiencia depende de la naturaleza del filtro de carbón activado del que se trate. Ha sido usada para reducir la fototoxicidad de muchos herbicidas y otros compuestos químicos en suelos cultivados, entre otras aplicaciones.

8 – Extracción y oxidación con fluidos supercríticos: la extracción con fluidos supercríticos utiliza solventes (fluido supercrítico: sustancia en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico) como el dióxido de carbono (CO_2), metano, propano, butano, y agua para separar un componente de otro y extraerlo. La extracción se hace usualmente de un suelo contaminado, pero también de agua superficial o subterránea.

La oxidación con fluidos supercríticos involucra la oxidación de solutos orgánicos en un medio acuoso usando oxidantes como oxígeno y peróxido de hidrógeno a presión y temperatura por sobre el punto crítico del agua ($374.3^\circ C$ y 22.12 Mpa) para convertir los contaminantes en subproductos simples.

En la extracción con fluidos supercríticos, el mecanismo de descontaminación es similar a la extracción con solvente, sin embargo, debido a las propiedades de transporte del fluido supercrítico, la extracción supercrítica es más eficiente, requiere menos energía, no deja

residuo y toma menos tiempo. Durante el proceso, el fluido de extracción es bombeado a una zona donde es calentado hasta condiciones supercríticas y luego inyectado en la matriz para difundir y disolver los materiales a extraer; conducidos por el gradiente de concentración; los contaminantes a ser removidos pasan de la matriz al fluido. Con el procesado hidrotérmico, los contaminantes se convertirán en dióxido de carbono, nitrógeno y agua.

1.4 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS COMBINADOS

En los últimos años, el uso de microorganismos que degraden contaminantes específicos en el tratamiento de efluentes ha brindado una manera efectiva de incrementar la degradación de contaminantes orgánicos. Sin embargo, debido a la pérdida de microorganismos degradadores que son lavados del sistema o predados por protozoos, se ha registrado que las tasas elevadas de degradación no persisten por largo tiempo en los sistemas de tratamiento de efluentes, siendo la persistencia de las bacterias en el sistema un requisito para mantener su capacidad de degradación.

La inmovilización de los microorganismos se ha sugerido como estrategia para mantener la eficiencia de los sistemas de tratamiento de efluentes (Li *et al* 2013). El empleo de células inmovilizadas ofrece muchas ventajas por sobre el uso de células plantónicas en el tratamiento de contaminantes, como por ejemplo: posibilita el desarrollo de una mayor densidad celular, reduce el período de “puesta en marcha” del biorreactor, incrementa la estabilidad del sistema protegiendo a las células de la exposición directa a compuestos tóxicos y facilita la separación y reutilización de la biomasa (Chen *et al* 2016).

Existen una variedad de matrices de soporte ya sea que impliquen la formación de biofilm o el atrapamiento de las células en polímeros (Alessandrello, Tomás *et al* 2017). Los biofilms son comunidades microbianas estructuradas en las cuales los microorganismos se adhieren de modo irreversible a una superficie, embebiéndose en una matriz extracelular de sustancias poliméricas producidas por dichas células (Das *et al* 2012). El desarrollo del biofilm es un proceso secuencial condicionado por factores celulares y ambientales (Figura 1-3).

En un primer paso el sustrato es acondicionado por distintas moléculas orgánicas e inorgánicas secretadas por los microorganismos proveyendo de este modo un sustrato favorable para el asentamiento de las células. El acondicionamiento de la superficie es seguido por la interacción de las células planctónicas. En un segundo paso, las células microbianas se adhieren a la superficie primeramente en una fase reversible y luego de modo irreversible. En un tercer paso, la adhesión irreversible es seguida de la multiplicación celular. Las células secretan Sustancias Poliméricas Extracelulares (en inglés EPS) que adhieren las células a la superficie y entre ellas. La matriz EPS está formada por polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos: estos proveen la estabilidad mecánica de los biofilms (Shukla *et al* 2014).

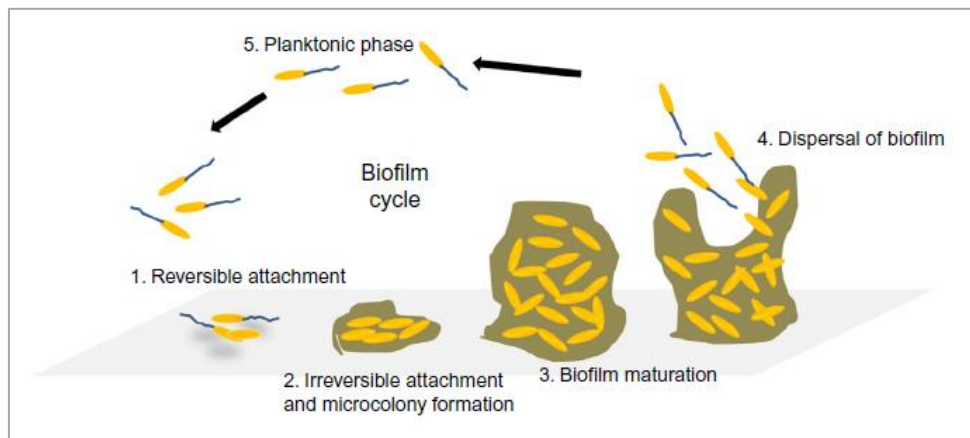


Figura 1-3. Pasos en la formación del biofilm (Shukla et al 2014)

Son diversos los materiales que se han usado como soporte para la inmovilización de microorganismos con fines ambientales, entre ellos se incluyen biosólidos, suelos enmendados con carbón, arcilla, estiércol o turba. Debido a que dichos materiales presentan una gran variabilidad en su calidad y composición, se ha preferido el uso de polímeros naturales que forman matrices porosas tales como el alginato y el agar (Martínez Trujillo y García Rivero 2012). Entre los polímeros sintéticos que han sido usados como matrices para inmovilización con el objetivo de emplearlos en procesos de biorremediación se puede mencionar el poliuretano, el sol gel, poliacrilonitrilo, poliacrilamida y alcohol polivinílico (Alessandrello, Tomás *et al* 2017, Yordanova *et al* 2009., Zhang *et al* 2007).

El uso de reactores de biofilms en protocolos de biorremediación ha aumentado notablemente en los últimos años, con la idea de resolver las limitaciones que se presentan en procesos de detoxificación en el ambiente (Singh *et al* 2006, Halan *et al* 2012). En el año 2005, Johnsen y col. demostraron que los biofilms incrementan la solubilidad de los HAPs, y en consecuencia su transferencia de masa, su biodisponibilidad y por lo tanto la velocidad de biotransformación. Además, confirmaron que la formación de biofilm era el principal mecanismo que ofrecían las bacterias para contrarrestar los problemas de transferencia de masa. Más tarde, otros trabajos mejoraron notablemente la eficiencia en la remoción de una mezcla de hidrocarburos, al emplear un sistema de biofilms mixtos con inóculos de lodos activados (Rodríguez y Bishop 2008) y destacaron también la importancia del co-metabolismo y el uso de biosurfactantes como estrategia para aumentar la eficiencia de degradación.

El uso de biocatalizadores inmovilizados en una matriz inerte para la degradación de contaminantes ofrece todas las ventajas que presentan los biofilms. Kargi y Eker (2005) reportaron la degradación completa de 2,4-diclorofenol (DCP) en un reactor de biofilm en tubo rotatorio perforado, con una biomasa microbiana mixta con el suplemento de una cepa de *Pseudomonas putida* degradadora de DCP. Los microorganismos inmovilizados representan entonces herramientas biológicas eficientes para la remoción de contaminantes ambientales, debido principalmente a la elevada densidad celular alcanzada y a la

propiedad de inmovilizar los compuestos tóxicos, favoreciendo la remoción y su posterior degradación (Tribelli *et al* 2012).

Si bien los tratamientos biológicos se muestran como muy promisorios en la remediación de contaminantes, el tiempo que insume la biorremediación de los hidrocarburos totales del petróleo es relativamente prolongado y muchas veces resulta en un proceso de remoción incompleta (Ioannou *et al* 2015, Xu *et al* 2015b).

En algunos casos, la toxicidad de los subproductos de degradación compromete la capacidad de los microorganismos de mineralizar completamente los contaminantes, es por esto que el uso de tratamientos únicamente biológicos para la remediación puede tener limitaciones en la degradación de materia no biodegradable o compuestos muy tóxicos. Para evitar estos inconvenientes, las investigaciones sobre degradación de contaminantes orgánicos se han centrado en la combinación de tratamientos biológicos y procesos de oxidación avanzada (POA). Estos últimos se basan en la generación de compuestos fuertemente oxidantes capaces de reaccionar no selectivamente con cualquier compuesto orgánico (Giannakis *et al* 2015, Xu *et al* 2015a).

La oxidación química es un método útil para la remediación de ambientes contaminados con petróleo y sus derivados por ser un método no selectivo y no verse afectado por la toxicidad del contaminante. Diferentes oxidantes han sido usados en este tipo de tratamientos: reactivo de Fenton, persulfato, permanganato, ozono, entre otros (Oh y Shin 2014, Li *et al* 2014). El reactivo de Fenton emplea peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como oxidante, que acoplado a iones ferrosos (Fe^{+2}) solubles genera radicales libres altamente reactivos (OH^{\bullet}) capaces de oxidar una variedad de contaminantes orgánicos en medio ácido, obteniéndose como producto dióxido de carbono y agua (Bernatené *et al* 2015, Villa *et al* 2010). Se ha demostrado que no es necesaria la adición de hierro soluble como catalizador en suelos ricos en óxidos naturales como hematita α - Fe_2O_3 , goethita α - $FeOOH$, magnetita Fe_3O_4 , ferrihidrita, MnO y Al_2O_3 (Kulik *et al* 2006, Sherwood y Cassidy 2014).

Si bien la oxidación química ha mostrado resultados prometedores a escala de laboratorio en procesos de remediación de petróleo y sus derivados, es necesario avanzar en investigaciones sobre el éxito de estos tratamientos *in situ*. Se requiere, por ejemplo, la optimización de parámetros como la relación concentración de peróxido de hidrógeno/concentración de hidrocarburo con el correspondiente porcentaje de petróleo oxidado para cada tipo particular de suelo (Lim *et al* 2016).

A la fecha, se han desarrollado una amplia variedad de estudios en los cuales el componente biodegradable de la contaminación fue eliminado biológicamente y los compuestos recalcitrantes han sido degradados con la aplicación de tratamientos de oxidación química. La contaminación producida por hidrocarburos del petróleo ha mostrado una remediación más eficiente cuando se aplicaron tecnologías combinadas, que incluyeron tratamientos biológicos y químicos, en comparación con los mismos métodos aplicados individualmente. Estas estrategias combinadas se han aplicado tanto en efluentes líquidos: -con el tratamiento biológico como método primario (Chen *et al* 2017, Derudi *et al* 2007) -o secundario a la oxidación química (Goel *et al* 2010, Christensen *et al* 2009),

como en suelos, con las mismas secuencias metodológicas mencionadas anteriormente: -tratamiento biológico primario (Gong 2012, Del Moro *et al* 2013), o –tratamiento biológico secundario (Silva Castro *et al* 2013, Lu *et al* 2010).

Los análisis de toxicidad y biodegradabilidad son significativos a la hora de aplicar métodos combinados de procesos Fenton y tratamientos biológicos en aguas residuales. Los análisis de toxicidad se hacen usualmente a través de tests de toxicidad aguda usando microorganismos como *D. magna*, *Selenastrum capricornutum*, *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas (fluorescens o putida)*, *Escherichia coli*, etc. Además los ensayos respirométricos han sido usados como un método eficiente para medir la toxicidad aguda dado que la demanda de oxígeno representa la actividad y viabilidad de microorganismos aeróbicos (Huang *et al* 2017).

La biodegradabilidad puede ser monitoreada a través de análisis de DBO5 (Demanda Biológica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno), calculando la relación DBO5/DQO. Esta relación muestra la proporción de materia orgánica que es biodegradable en condiciones aeróbicas.

Estas instancias de análisis de toxicidad y biodegradabilidad usadas en el tratamiento de matrices líquidas pueden usarse como referencia para tratamientos en suelo.

En suma, en la aplicación de tratamientos combinados existen algunos puntos a los que debe ponerse especial atención (Huang *et al* 2017):

- a) La dosis apropiada de oxidante químico. Muchos oxidantes pueden inducir la mineralización del efluente, llevando a la disminución de las fuentes de carbono para los microorganismos involucrados en el subsiguiente tratamiento.
- b) El efecto de la reacción de Fenton en los microorganismos indígenas. El valor óptimo de pH para la reacción de Fenton es 2.8–3.0, lo que puede ser desfavorable para el crecimiento de algunos microorganismos indígenas.
- c) La inhibición en el segundo tratamiento por parte de sustancias producidas en el tratamiento previo. La materia orgánica producida en procesos de biotratamiento podría reducir la producción de radicales hidroxilo por reaccionar con catalizadores en el subsiguiente proceso Fenton.
- d) La competencia por radicales hidroxilo. Algunas sustancias en el medio ambiente, como la materia orgánica del suelo, pueden competir por los radicales hidroxilos con los contaminantes blanco. En diversas investigaciones se ha encontrado que esta competencia lleva a una declinación en la eficiencia de remediación (Zapata *et al* 2008).
- e) El análisis de parámetros incluyendo sólidos volátiles, sólidos suspendidos totales, carbono orgánico total, pH, temperatura y nutrientes. El crecimiento de los microorganismos es afectado por la disponibilidad de nutrientes (Sirtori *et al* 2009).

A la fecha existe una variedad creciente de tratamientos de remediación y los métodos más apropiados a utilizar dependerán del tipo de contaminante y las condiciones específicas del sitio. Un acabado conocimiento de las condiciones del ambiente afectado, la naturaleza,

composición y propiedades de los contaminantes, así como su destino, transporte, distribución, mecanismo de degradación, interacción con los microorganismos, factores extrínsecos e intrínsecos que afecten la remediación y el potencial impacto de la medida, determinarán la elección del método. Es posible que se requiera de más de un método de remediación para remover, contener o degradar contaminantes y materiales peligrosos en los sitios impactados. Es recomendable que la selección de uno o más métodos de remediación involucren tecnologías adaptables, científicamente defendibles, sostenibles, no invasivas, amigables con el ambiente y costo efectivas ya que la remoción de la contaminación por hidrocarburos de petróleo constituye una tarea laboriosa y económicamente costosa (Ossai *et al* 2020).

1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La persistencia de los hidrocarburos de petróleo en el ambiente hace necesario el planteo de estrategias para lograr su remoción de manera eficiente. En función de esto, se plantean las siguientes hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

Hipótesis 1: La aplicación de tratamientos biológicos y químicos combinados para la remoción de hidrocarburos de petróleo en matrices contaminadas artificialmente es más eficiente que la aplicación de los mismos tratamientos aplicados individualmente.

Hipótesis 2: El tratamiento de bioaumentación para la remoción de petróleo en microcosmos de suelo contaminado artificialmente es más efectivo que la atenuación natural.

Objetivos:

El objetivo general del presente trabajo es evaluar la eficiencia de sistemas de tratamiento biológico y químico para la remoción y degradación de hidrocarburos de petróleo en medio líquido y suelo contaminados artificialmente.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Realizar la inmovilización de bacterias en matrices de poliuretano en reactores (tratamiento biológico).
- 2) Cuantificar los hidrocarburos removidos (biodegradados y adsorbidos en la matriz de inmovilización).
- 3) Cuantificar la biomasa bacteriana mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).
- 4) Comparar la eficiencia de remoción de hidrocarburos en sistemas de tratamiento con cepas de *Pseudomonas* y *Gordonia* por separado y en sistemas acoplados.
- 5) Evaluar la eficiencia de degradación de petróleo en suelos inoculados (bioaumentación) versus suelos no inoculados (atenuación natural).
- 6) Cuantificar la degradación de hidrocarburos con la aplicación de oxidantes químicos (Fenton) y comparar con los resultados obtenidos a través del tratamiento biológico.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS

Las cepas bacterianas que se emplearon en el presente estudio, *Pseudomonas monteilii* P26 (GenBank Acc. Num. HE798531) y *Gordonia* sp. H19 (GenBank Acc. Num. LN680636) han sido aisladas previamente de sedimentos contaminados de la Patagonia y seleccionadas por su habilidad para degradar HAPs (Isaac *et al* 2013, 2015).

Estas cepas han demostrado degradar eficientemente HAPs de bajo y alto peso molecular (Isaac *et al* 2015). En este estudio se evaluó la capacidad degradadora de HAPs de distintas *Pseudomonas* y actinobacterias tanto en cultivos puros como mixtos. Los resultados mostraron que monocultivos de *Pseudomonas monteilii* P26 pudieron degradar HAPs de bajo peso molecular (naftaleno, fenantreno), aunque no evidenciaron una capacidad significativa de remoción de HAPs de alto peso molecular. Contrariamente, monocultivos de *Gordonia* sp. H19 evidenciaron relativa eficiencia en la degradación de HAPs de alto peso molecular (pireno) mientras que no pudieron remover HAPs de bajo peso molecular del medio de cultivo.

Por otra parte, estas cepas mostraron diferencias también en su capacidad bioemulsificante cuando fueron testeadas individualmente. La liberación de moléculas con actividad emulsificante al medio de cultivo es una de las estrategias biológicas más importantes de los microorganismos degradadores de HAPs para incrementar la biodisponibilidad de estos hidrocarburos (Ron y Rosenberg 2002). Mientras que *Pseudomonas monteilii* P26 mostró capacidad emulsificante, en cultivos de *Gordonia* sp. H19 dicha capacidad no fue detectada.

En cuanto a los cultivos mixtos (16 combinaciones), en todos los casos probaron ser más eficientes en la remoción de fenantreno y pireno que los cultivos puros, lo que sugiere que las cepas actuaron en forma sinérgica como verdaderos consorcios. El cultivo mixto “C15” integrado por *P. monteilii* P26, *Pseudomonas* sp. N3, *Gordonia* sp. H19, y *Rhodococcus* sp. F27 mostró la mayor remoción de pireno, alcanzando valores cerca de seis veces mayores que los de estas cepas individualmente. Además, este consorcio mostró actividad bioemulsificante en presencia de los hidrocarburos testeados, lo que colaboró notablemente con su biodegradación. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio descripto, la remoción máxima de pireno fue acompañada por una elevada actividad bioemulsificante del cultivo mixto.

En un trabajo posterior (Isaac *et al* 2015) se evaluó la capacidad de formación de biofilm y de degradación de HAPs de las cepas integrantes del cultivo mixto descripto (C15). En el ensayo individual de las cepas, las pseudomonas mostraron capacidad de formación de biofilm, aunque limitada y solo evidente en presencia de HAPs en el medio de cultivo, mientras que *Gordonia* sp. H19 no logró una adhesión fuerte al soporte incluso en presencia de hidrocarburos.

Los resultados fueron muy diferentes cuando se evaluó el cultivo mixto; la formación de biofilm fue casi un 180 % mayor que la del cultivo puro de mayor capacidad (*Pseudomonas*

sp. N3). La presencia de HAPs en el medio de cultivo también estimuló la formación de biofilm en este caso.

2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL-MEDIO LÍQUIDO

2.2.1 Biorreactores y condiciones de cultivo

Para los experimentos de remoción de HAPs en un medio líquido se armaron reactores que contenían la biomasa bacteriana inmovilizada. La inmovilización de los microorganismos se ha sugerido como estrategia para mantener la eficiencia de los sistemas de tratamiento de efluentes debido a que, de otro modo, la pérdida de los microorganismos libres siendo lavados del sistema o predados por protozoos produce una disminución de las tasas de degradación en el tiempo (Li *et al* 2013).

Existe una variedad de matrices de soporte para la inmovilización; en cuanto a los soportes poliméricos, se utiliza gelatina, agar, gel de poliacrilamida, alginato de calcio, poliuretano, carragenina, quitosano, alcohol polivinílico o sol-gel como materiales para la formación de la matriz. También se han empleado con éxito biosoportos a base de cáscara de arroz, maní o coco (Bayat *et al* 2015). Samhan y colaboradores (2017) mostraron en un reciente estudio que la biomasa bacteriana formada sobre esponjas (Phylum *Porifera*) fue más densa en comparación con otros biosoportos como por ejemplo, las hojas de palma.

El soporte de inmovilización utilizado en el presente trabajo fue la espuma de poliuretano, polímero derivado de la condensación de poli-isocianatos y polialcoholes (Foto 2-1). Una de sus ventajas es la alta porosidad, que permite retener a las células sin limitaciones difusionales para el sustrato, el producto e incluso para el oxígeno (Kadakol *et al* 2011).

Previo a la incorporación de la biomasa al sistema, los microorganismos fueron subcultivados en agua de maceración de maíz (10 % v/v) por 48 horas a 30°C y 180 rpm en agitación.

Cada reactor contenía un lecho de piezas rectangulares de espuma de poliuretano. El fluido con los microorganismos se hizo circular por el sistema, impulsado por una bomba multicanal (Watson Marlow) durante 48 horas para posibilitar la inmovilización de los mismos en el soporte. Luego se agregó medio fresco (agua de maceración de maíz) de manera continua al sistema por otras 48 horas (Figura 2-1 y Foto 2-2). Finalizado este proceso se procedió a hacer circular la solución de 30 ml (acetona) que contenía 300 µl de la mezcla de hidrocarburos (acenafteno, fluoranteno y pireno) a 50 ppm cada uno de ellos (Figura 2-2). El flujo de circulación fue de 0, 22 ml por minuto.

La solución con la mezcla de hidrocarburos se renovó diariamente y se tomaron muestras con el fin de cuantificar el contenido remanente de hidrocarburos. El proceso descrito se aplicó a reactores que contenían biomasa inmovilizada de P26 o de H19 (Foto 2-3, Foto 2-4). Además, se realizó el mismo tratamiento usando ambas cepas combinadas (Foto 2-5), así como también una prueba control.

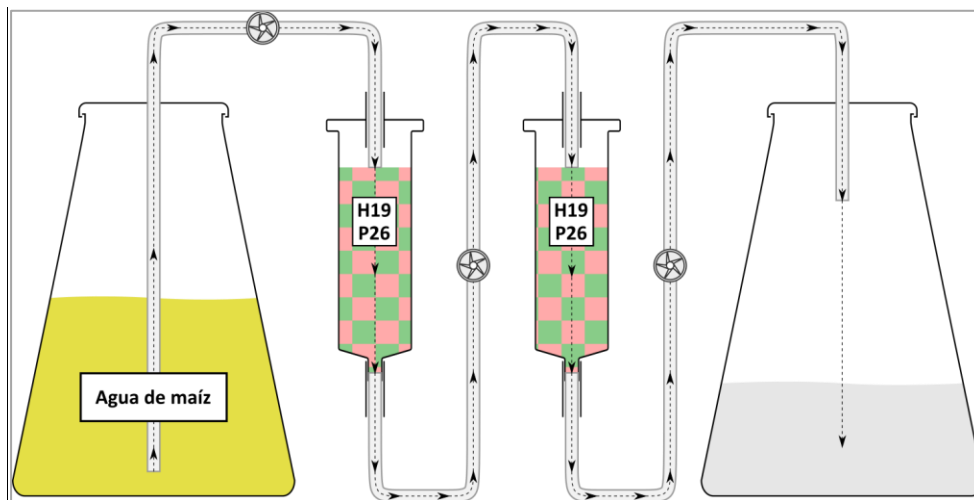


Figura 2-1. Esquema del flujo de circulación del agua de maceración de maíz hacia los reactores (P26 y/o H19) y finalmente al descarte

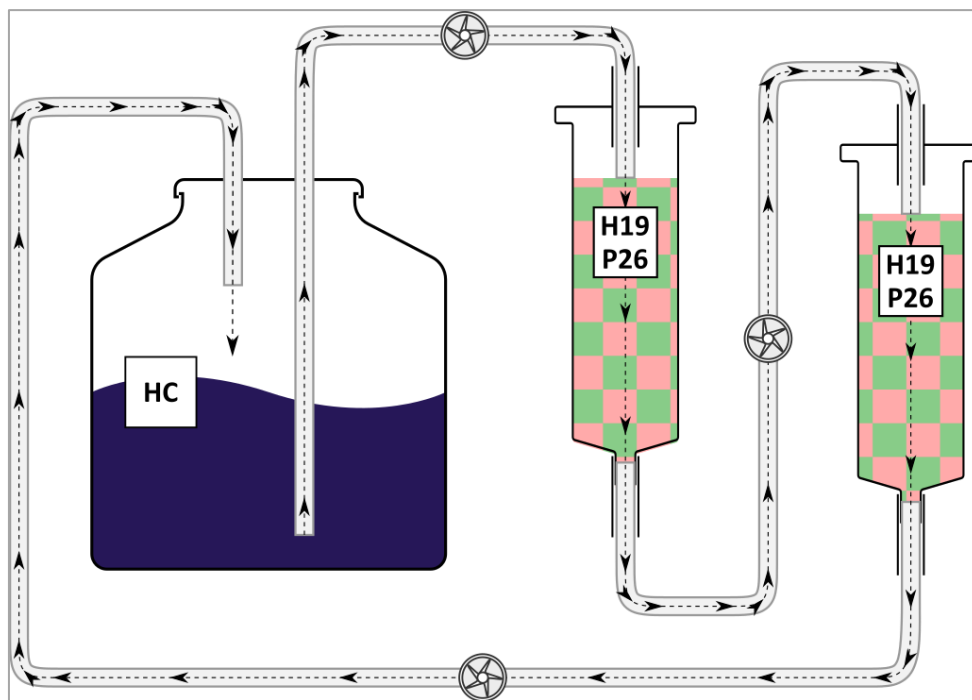


Figura 2-2. Esquema del flujo de circulación del fluido con hidrocarburos desde y hacia los reactores (P26 y/o H19)

Las estructuras moleculares de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) mencionados se muestran a continuación (Figura 2-3). El acenafteno ($C_{12}H_{10}$) fluoranteno ($C_{16}H_{10}$) y pireno ($C_{16}H_{10}$) se presentan como compuestos incoloros, blanquecinos o amarillentos. En la industria química se emplean en la elaboración de colorantes, insecticidas, fungicidas y plásticos (página web de *National Library of Medicine*).

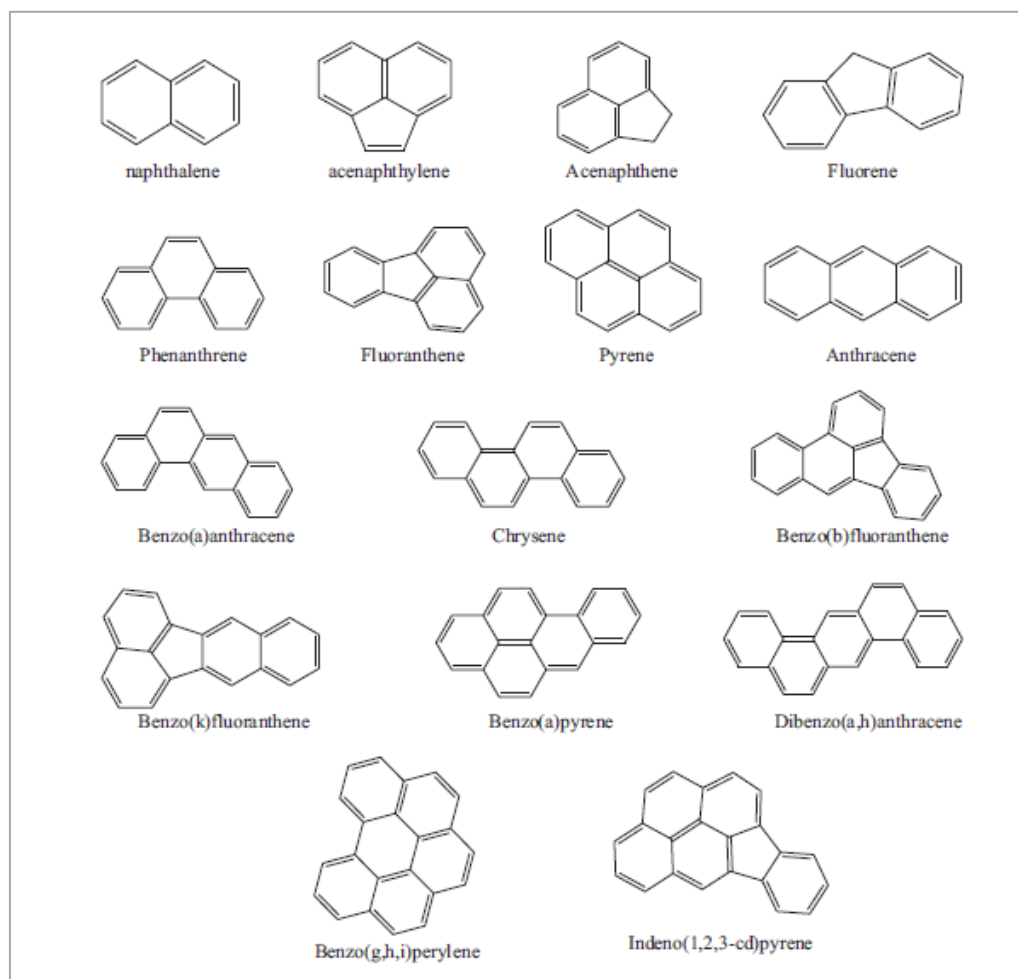


Figura 2-3. Estructura molecular de HAPs (Hussain et al 2018)

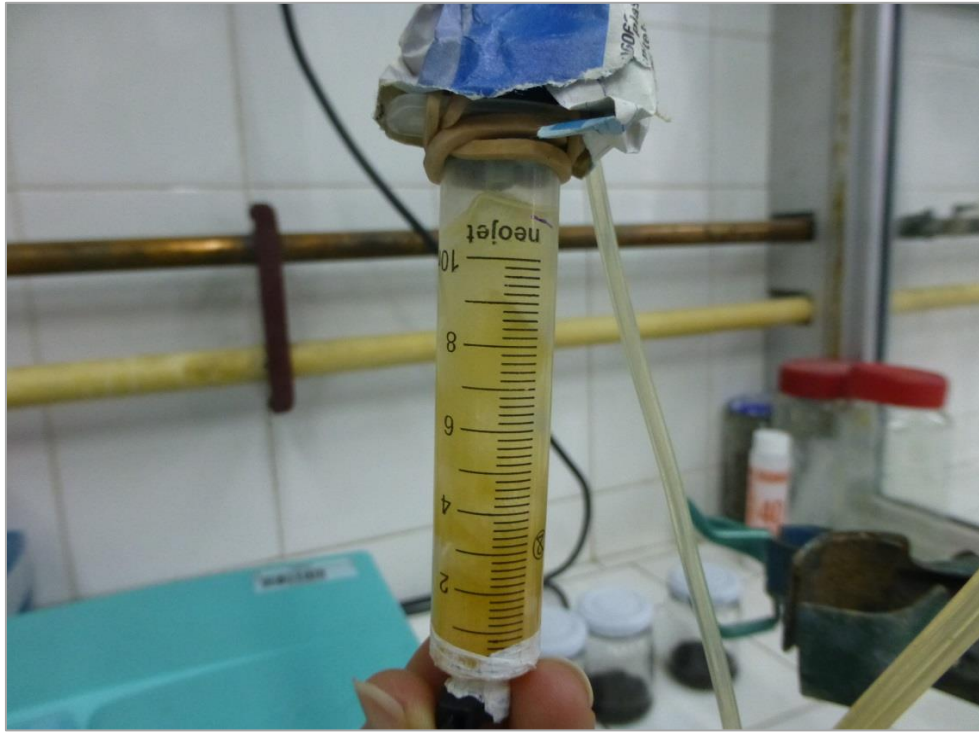


Foto 2-1. Vista en detalle del reactor conteniendo el soporte de inmovilización (espuma de poliuretano).

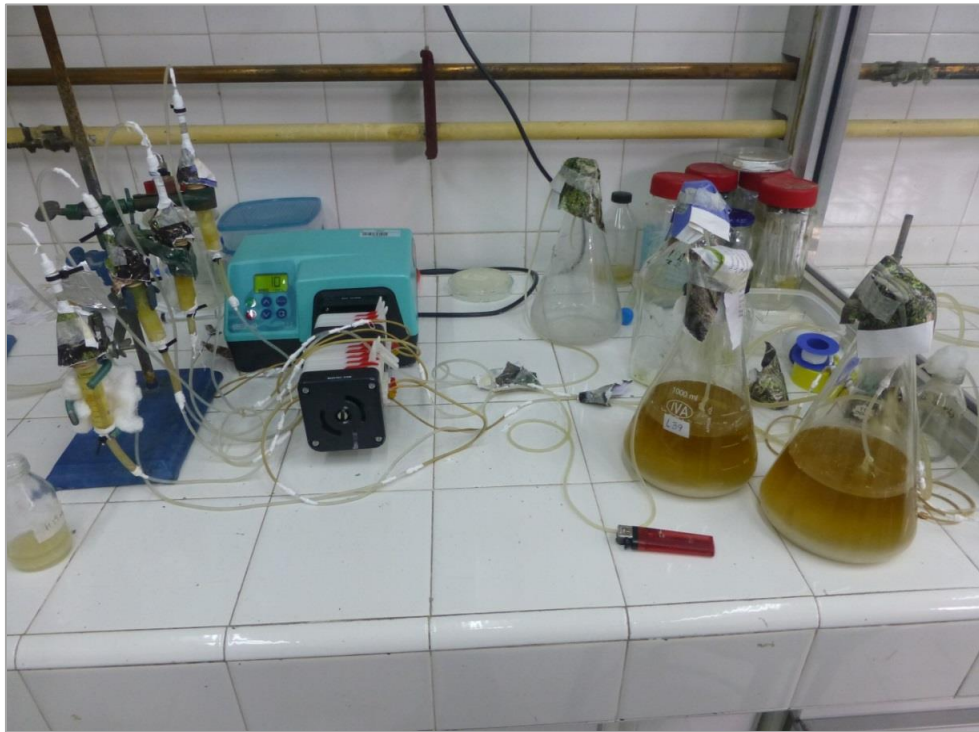


Foto 2-2. Etapa de circulación del medio fresco (a la derecha de la foto) en el sistema.

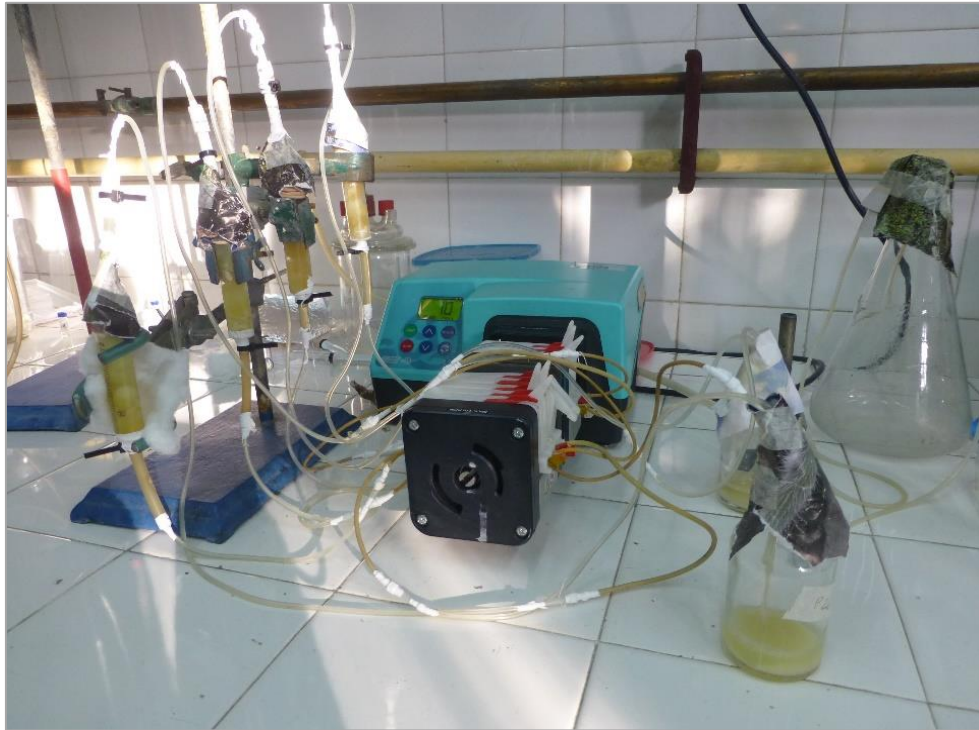


Foto 2-3. Vista del sistema de circulación. Los reactores contienen biomasa inmovilizada de P26 (2 reactores) y H19 (2 reactores).

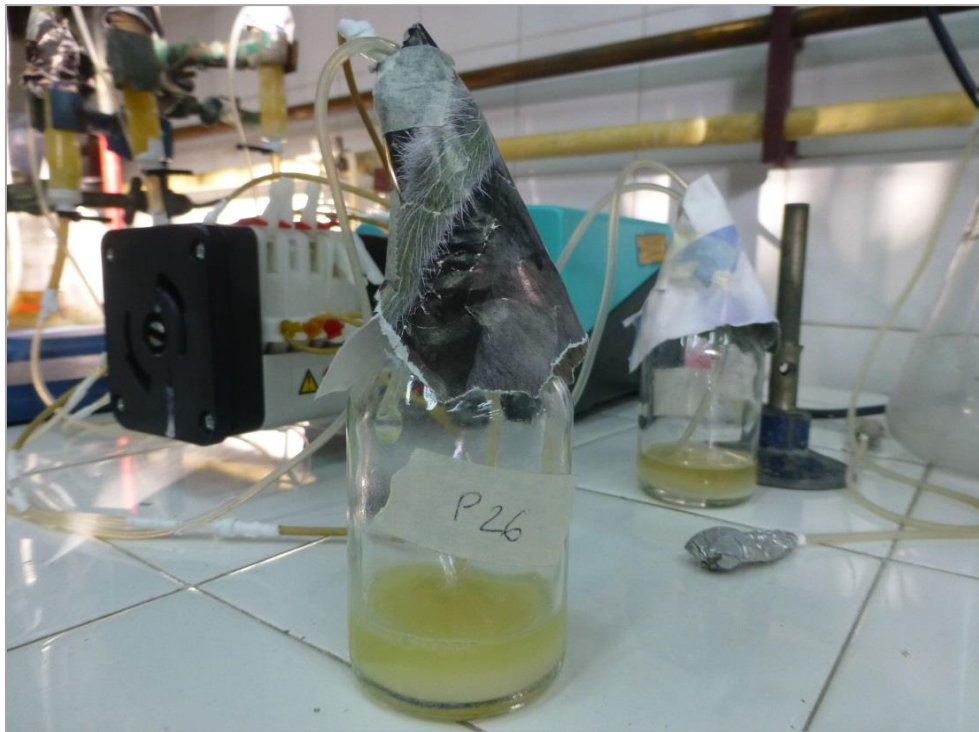


Foto 2-4. Vista en detalle de frasco con la mezcla de hidrocarburos circulante en reactores con P26 inmovilizada.

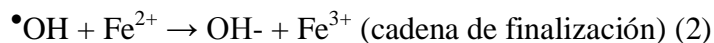
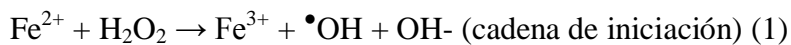


Foto 2-5. Vista del sistema integrado por la bomba multicanal, frasco con mezcla de hidrocarburos y reactores con co-cultivo P26-H19 inmovilizado.

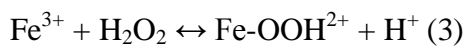
2.2.2 Tratamiento químico con reactivo de Fenton

El proceso Fenton es un sistema ampliamente aplicado que incluye reacciones entre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion ferroso (Fe^{2+}) que generan radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) en medio ácido (Bernatené *et al* 2015).

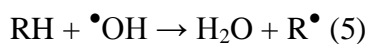
La oxidación utilizando los reactivos de Fenton, produce la disociación del oxidante y la formación de reactivos $\bullet\text{OH}$ que destruyen de manera no selectiva los contaminantes orgánicos hasta compuestos inocuos. Los reactivos de Fenton son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion ferroso (Fe^{2+}), ambos generan los $\bullet\text{OH}$ mediante la siguiente cadena de reacción:



Como se observa en las reacciones (1) y (2), el Fe^{2+} inicia la reacción y cataliza la descomposición del H_2O_2 en $\bullet\text{OH}$. Sin embargo, la formación de nuevos Fe^{3+} puede descomponer el H_2O_2 en H_2O y O_2 formando iones Fe^{2+} y radicales hidroxiperóxidos ($\text{HO}_2\bullet$).



En la reacción (5) se indica como los compuestos orgánicos (RH) son oxidados por los $\bullet\text{OH}$ mediante la sustracción de un protón culminando con la formación de radicales orgánicos ($\text{R}\bullet$):



En este trabajo, a las muestras obtenidas de los reactores se aplicó posteriormente el proceso Fenton. Dicha oxidación química se llevó a cabo usando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hierro (Fe).

Se centrifugó el líquido tratado biológicamente para separar las bacterias del líquido. Al sobrenadante se lo llevó a pH 4 con H_2SO_4 (10 M). Luego se le agregó 20 mg/l de FeSO_4 heptahidratado (a partir de una solución 0,1M) y 300 mg/l de H_2O_2 (a partir de una solución al 30%, 100 volúmenes). Se incubó overnight con agitación a 30 °C.

Al término de la incubación se tomaron muestras y se determinó la concentración de HAP por HPLC y la DQO (demanda química de oxígeno- cantidad equivalente de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en la muestra). Para la medición de DQO se usó un kit de DQO (Chemetrics). La DQO se midió antes del tratamiento biológico (t0), después del biológico (antes del Fenton) y luego del biológico + Fenton.

2.2.3 Determinación de HAPs

La remoción de los HAPs se determinó cuantificando tanto aquellos hidrocarburos adsorbidos al soporte de inmovilización, mediante extracción con acetona, como los hidrocarburos en suspensión en el sistema.

Se tomaron muestras diariamente para la extracción de los hidrocarburos remanentes de los frascos que contenían la solución. Estas muestras, a las cuales se les agregó acetona, fueron homogeneizadas en un agitador vórtex y luego filtradas a través de un filtro de nylon de 0.22 mm. La muestra resultante se mantuvo refrigerada hasta el momento del análisis.

La concentración de HAPs fue determinada por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa aplicando una curva de calibración estándar. El equipo HPLC es un modelo Waters e2695 acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (PDA- photodiode array detector) (Waters 2998, Waters Corporation, MA, USA). Las muestras se inyectaron en una columna Phenomenex Spherisorb 5 ODS (2) (tamaño 250 x 4.60 mm). Se usaron dos fases móviles: 9:1 agua:- metanol (solvente A) y metanol (solvente B). Cada corrida se llevó a cabo con los siguientes programas de solventes: al principio, 20% de solvente A y 80% de solvente B por 10 min; luego, 10% de solvente A y 90% de solvente B por 3 minutos; y finalmente, 100% de solvente B por 7 minutos.

2.2.4 Cuantificación de biomasa bacteriana

Para la cuantificación de la biomasa bacteriana se realizó diariamente el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) del remanente en el fluido circulante del sistema.

Para ello, se hicieron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-6} (Figura 2-4) y las bacterias se cultivaron por el método de extensión en placa. De acuerdo a este método primeramente se vierte el medio (medio nutritivo agarizado) en placas de Petri y se deja solidificar; la muestra de la dilución correspondiente se pipetea sobre la superficie de la placa con agar para luego extenderse uniformemente mediante el empleo de varillas de vidrio estériles en forma de L (Espátula de Drigalsky) (Figura 2-5).

Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h y luego se realizó el recuento de colonias (UFC/ml x Factor de Dilución).

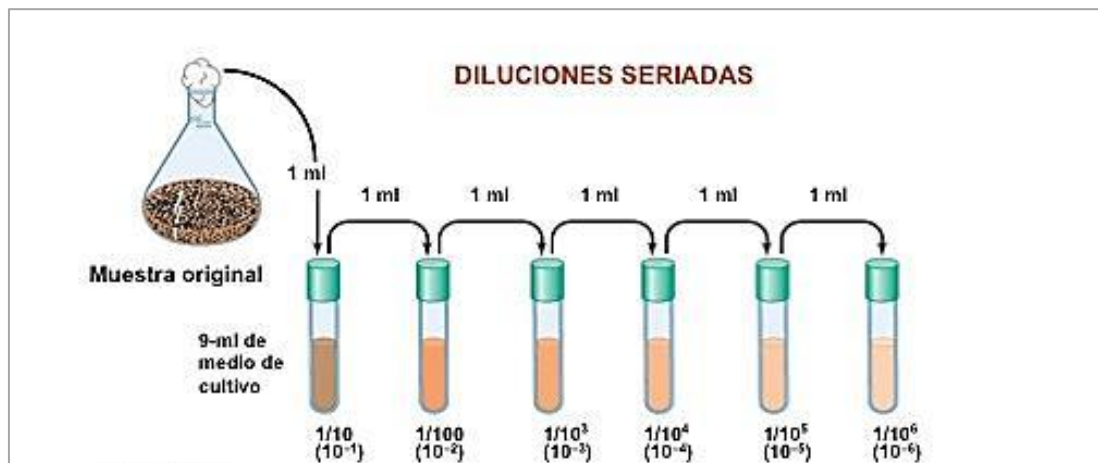


Figura 2-4. Esquema del proceso de diluciones seriadas. (Adaptado de www.diversidadmicrobiana.com, Universidad de Granada, España)



Figura 2-5. Método de siembra por extensión/diseñación en placa (Adaptado de www.depa.fquim.unam.mx, Universidad Nacional Autónoma de México)

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL-SUELO

2.3.1 Microcosmos y biorremediación de suelo

Para los ensayos de suelo se utilizó material obtenido de las inmediaciones del laboratorio PROIMI, sito en San Miguel de Tucumán (Coordenadas: Latitud $26^{\circ}48'38.86''S$; Longitud $65^{\circ}14'26.70''O$). El mismo fue caracterizado en la Cátedra de Edafología de la Facultad de Agronomía y Zootecnia (Universidad Nacional de Tucumán).

Descripción de las muestras	
Muestra espesor cm - n°	5-20 cm
pH (agua 1:2,5)	8,25
Materia Orgánica Oxidable % (Walkley-Black)	4,31
Carbono Orgánico, %	2,5
Fósforo disponible I ppm (Bray-Kurtz I)	7,5
Nitrógeno Total % (Kjeldhal)	0,249
Calcáreo %	2,43
Potasio (me/100g)	1,06
Salinidad Cees (dS/m)	0,83
Arcilla % (Hidrómetro de Bouyucos)	9,5
Limo % (Hidrómetro de Bouyucos)	33,5
Arena % (Hidrómetro de Bouyucos)	57
Clase Textural	Franco - Franco Arenoso

Las cepas bacterianas empleadas en los ensayos, *Pseudomonas monteilii* P26 y *Gordonia sp.* H19, se cultivaron previamente por separado en agua de maceración de maíz (10%, pH 7) durante 48 h a 30 °C y 180 rpm en agitación. La concentración alcanzada fue de 7,2 y 1,49 x 10⁹ UFC/ml para P26 y H19 respectivamente. Con estos cultivos se preparó una suspensión conteniendo 5 % v/v de ambas cepas en agua corriente.

El suelo no estéril utilizado se fraccionó en 6 frascos de vidrio con 20 g de suelo seco cada uno y se lo contaminó con 0,4 g de petróleo crudo (Foto 2-6). Luego se llevaron a cabo dos tratamientos:

A-Suelo no estéril contaminado con petróleo e inoculado con P26 y H19 (al 50% de capacidad de agua con la suspensión preparada ya descripta) (Foto 2-8);

B-Suelo no estéril contaminado con petróleo con el agregado de agua corriente (situación control, atenuación natural) (Foto 2-7). Se determinó el peso total del sistema en todos los casos.

Cada 48 horas se le agregó agua corriente al sistema de acuerdo a la variación de peso registrada de manera de que este se mantuviera constante y se mezcló el suelo mediante agitación mecánica para airear el sistema. De este modo se aseguró que el suelo permaneciera a 50% de capacidad de agua. La incubación se realizó a temperatura ambiente

(alrededor de 25 °C) en dos variantes, una de 21 días y otra de 33 días. Al día 10 y al día 22 de los ensayos se le agregaron a todos los microcosmos 200 μ l de agua de maceración de maíz (10%, pH 7) para estimular el crecimiento bacteriano.



Foto 2-6. Frascos de vidrio con suelo seco



Foto 2-7. Microcosmos-Situación control, atenuación natural



Foto 2-8. Microcosmos-Suelo inoculado con co-cultivo P26-H19

2.3.2 Tratamiento químico con reactivo de Fenton

El día 21 de los tratamientos se agregaron a los microcosmos 30 mmol H₂O₂/kg suelo (a partir de una solución al 30%, 100 volúmenes) y 0,6 mmol Fe (III): ácido cítrico/kg suelo (a partir de una solución 1:1 de sulfato férrico y ácido cítrico 1M, pH 7).

Luego de la aplicación del tratamiento químico en el tratamiento de 21 días y al finalizar el tratamiento de 33 días (12 días después del tratamiento químico) se cuantificó el petróleo remanente.

2.3.3 Extracción y cuantificación del petróleo

En los días 21 y 33 después del inicio del tratamiento se procedió a la extracción y cuantificación del petróleo remanente. A los microcosmos se les agregó 2 ml de agua, 2 ml de metanol y 5 ml de pentano. Se agitó mecánicamente por 1 minuto y luego en sonicador. Se tomó la fase orgánica y se repitió la extracción 6 veces. La fase orgánica colectada de las 6 extracciones se dejó evaporar en frascos previamente pesados y el petróleo remanente se determinó por gravimetría.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron los valores promedio y la diferencia entre los valores fueron determinadas usando análisis de la varianza (ANOVA) con el software Minitab 17.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 MEDIO LÍQUIDO

3.1.1 Remoción de HAPs: biorremediación

3.1.1.1 Remoción de HAPs utilizando cultivos puros y co-cultivos (P26-H19) inmovilizados

La remoción de acenafteno utilizando cultivos puros y co-cultivos fue aproximadamente de un 70% diario (Gráfico 3-1 y Gráfico 3-4). Se observó adsorción de HAPs en el soporte, como lo demuestra la remoción de los mismos en el sistema no inoculado. Esta remoción abiótica fue disminuyendo con el tiempo, lo que indicaría que el soporte se fue saturando. En el caso del fluoranteno y pireno (Gráfico 3-2, Gráfico 3-3, Gráfico 3-5 y Gráfico 3-6) puede observarse que luego de 5-6 días el porcentaje de remoción por parte de las bacterias aumentó paulatinamente, alcanzando aproximadamente un 65-70% en los co-cultivos, 60% en cultivos de P26 y un 100% en cultivos de H19. Este lapso de tiempo constituiría el período de adaptación del biofilm a la degradación de estos HAPs.

En todos los casos se observó una gran remoción de HAPs al día 1, posiblemente debida a la adsorción de estos hidrocarburos en el soporte. Una vez que el soporte comenzó a saturarse, la remoción disminuyó debido a la merma en la remoción abiótica. Al finalizar la semana de tratamiento, la remoción de HAPs se debió principalmente a la degradación bacteriana.

Remoción de HAPs en cultivos puros

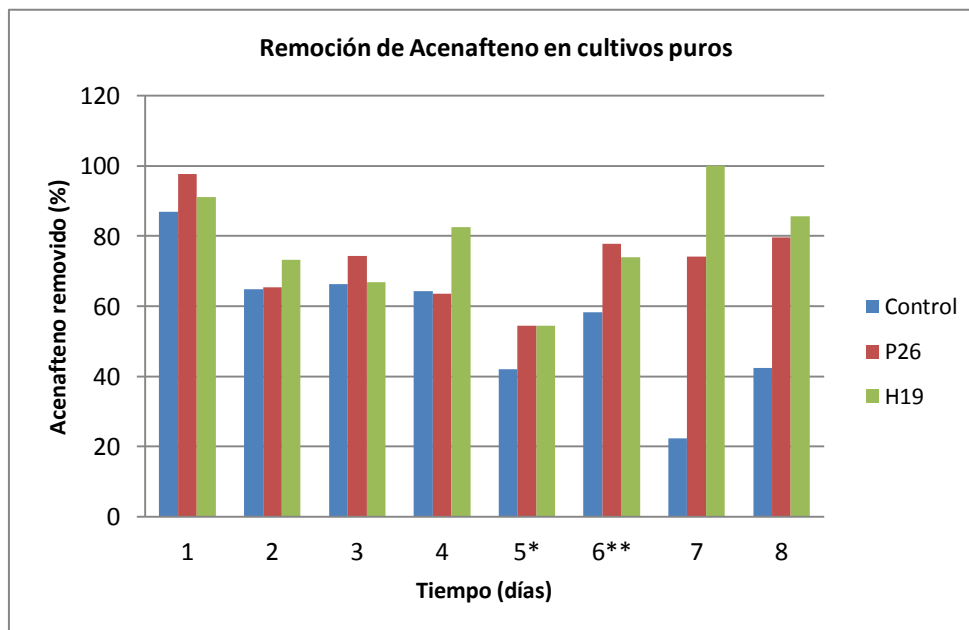


Gráfico 3-1. Remoción de acenafteno en cultivos puros de P26, H19 y en muestras Control. (*tratamiento de 72 h para ambas cepas** tratamiento de 48 h para H19). (Error del 5 %)

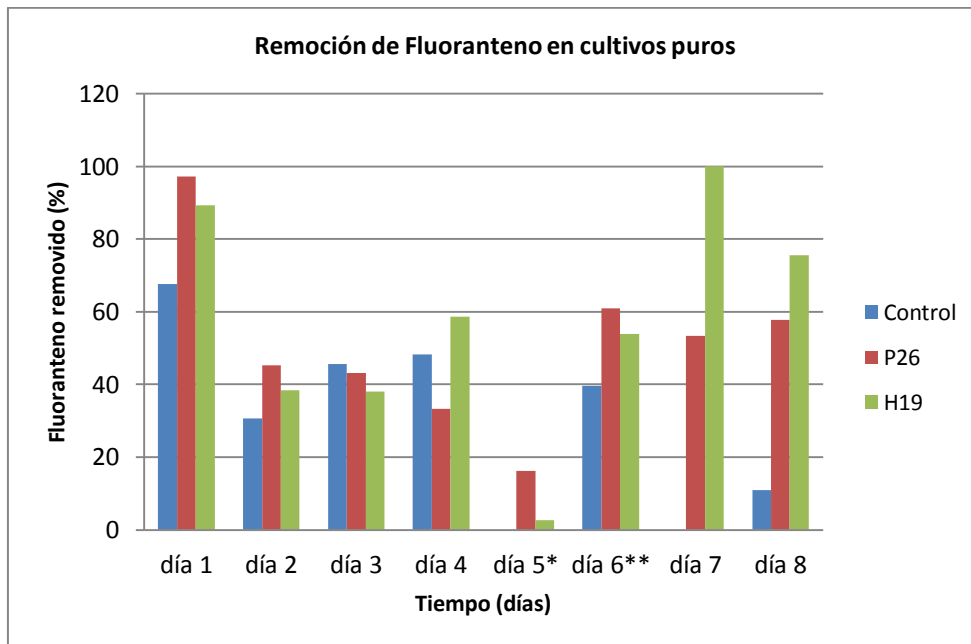


Gráfico 3-2. Remoción de fluoranteno en cultivos puros de P26, H19 y en muestras Control. (*tratamiento de 72 h para ambas cepas **tratamiento de 48 h para H19). (Error del 5 %)

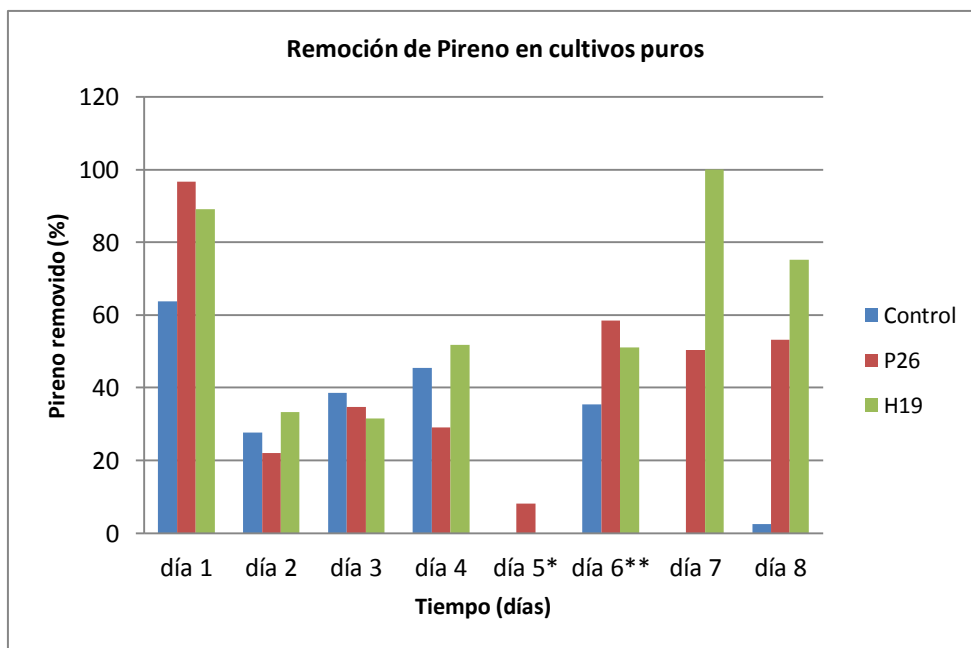


Gráfico 3-3. Remoción de pireno en cultivos puros de P26, H19 y en muestras Control. (*tratamiento de 72 h para ambas cepas **tratamiento de 48 h para H19). (Error del 5 %)

Remoción de HAPs en el co-cultivo P26-H19

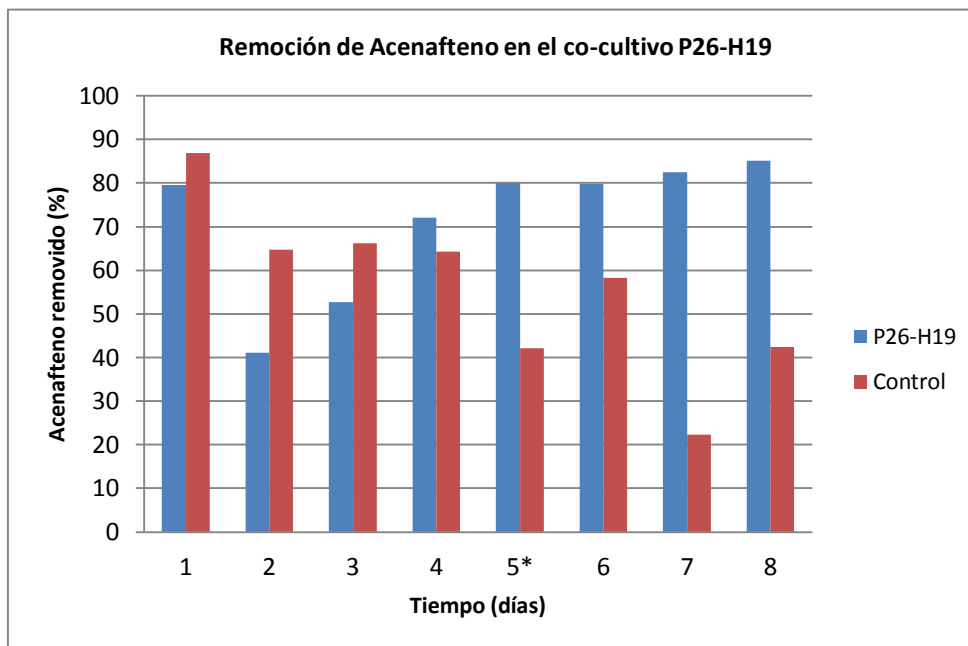


Gráfico 3-4. Remoción de acenafteño en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 48 h). (Error del 5 %)

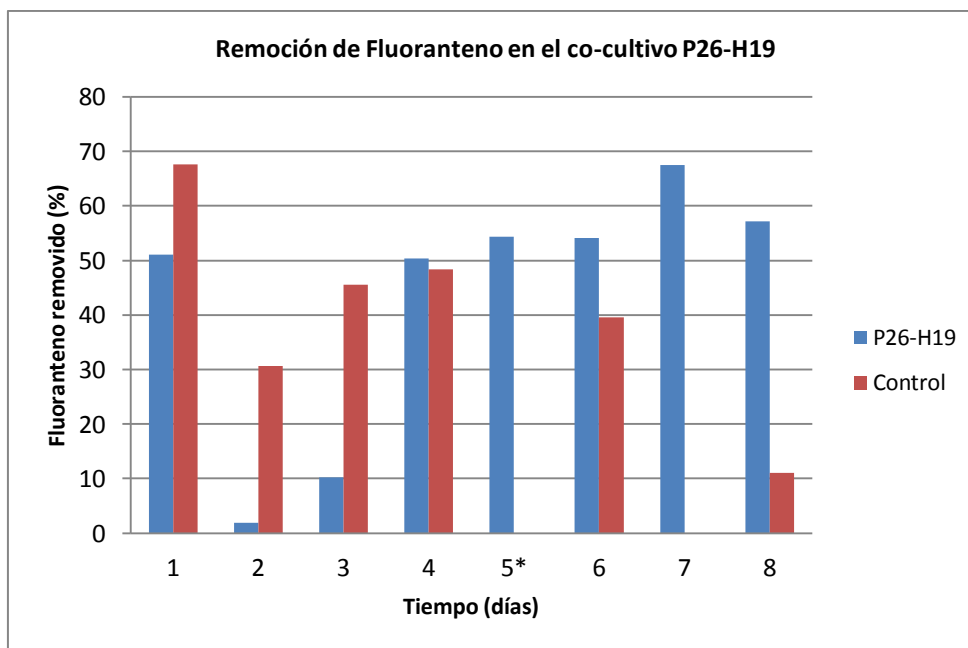


Gráfico 3-5. Remoción de fluoranteno en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 48 h). (Error del 5 %)

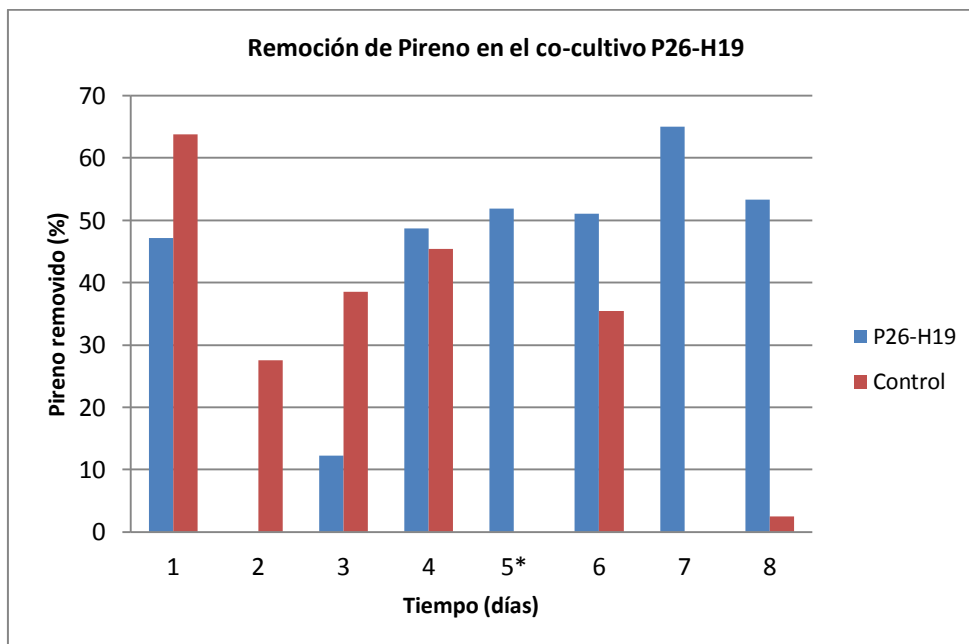


Gráfico 3-6. Remoción de pireno en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 48 h). (Error del 5 %)

Los gráficos a continuación muestran los porcentajes de remoción de HAPs a lo largo del tiempo tanto en el soporte abiótico como en los cultivos puros y en el co-cultivo P26-H19 (Gráfico 3-7, Gráfico 3-8, Gráfico 3-9).

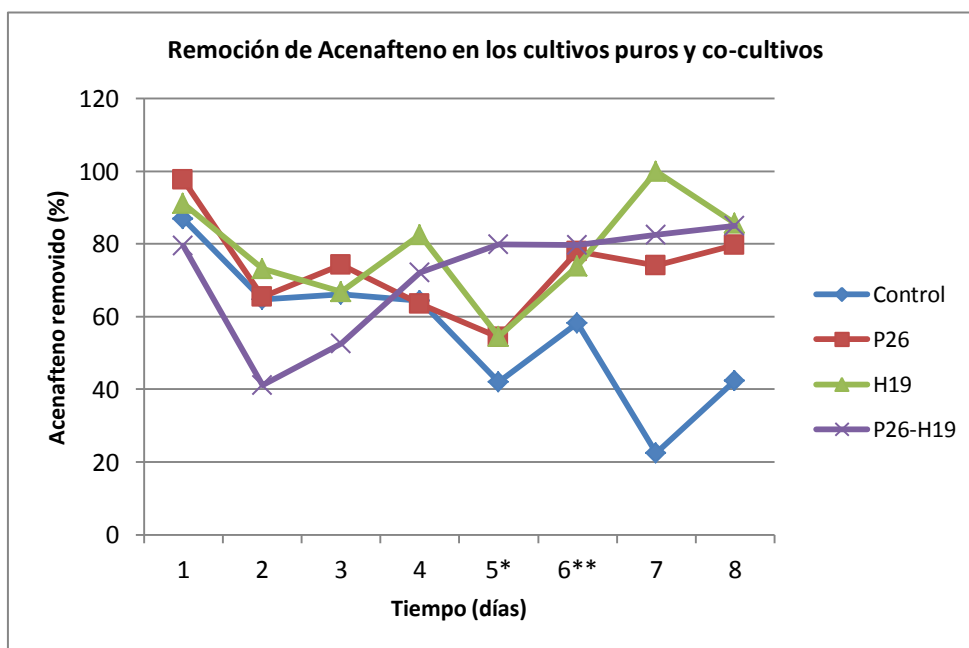


Gráfico 3-7. Remoción de acenafteno en cultivos puros de P26 y H19, en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 72 h para ambas cepas, **tratamiento de 48 h para H19).

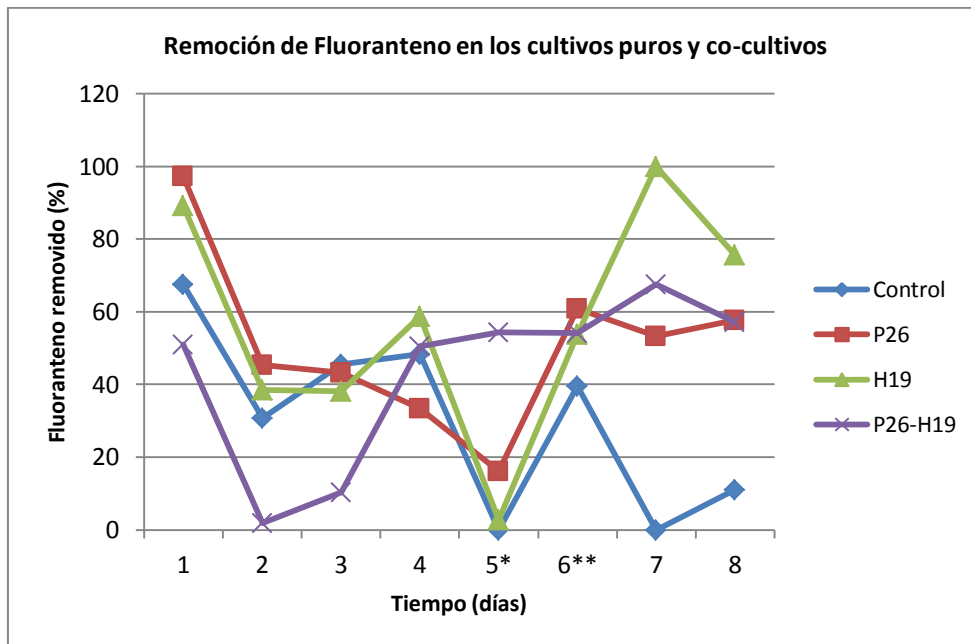


Gráfico 3-8. Remoción de fluoranteno en cultivos puros de P26 y H19, en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 72 h para ambas cepas, **tratamiento de 48 h para H19).

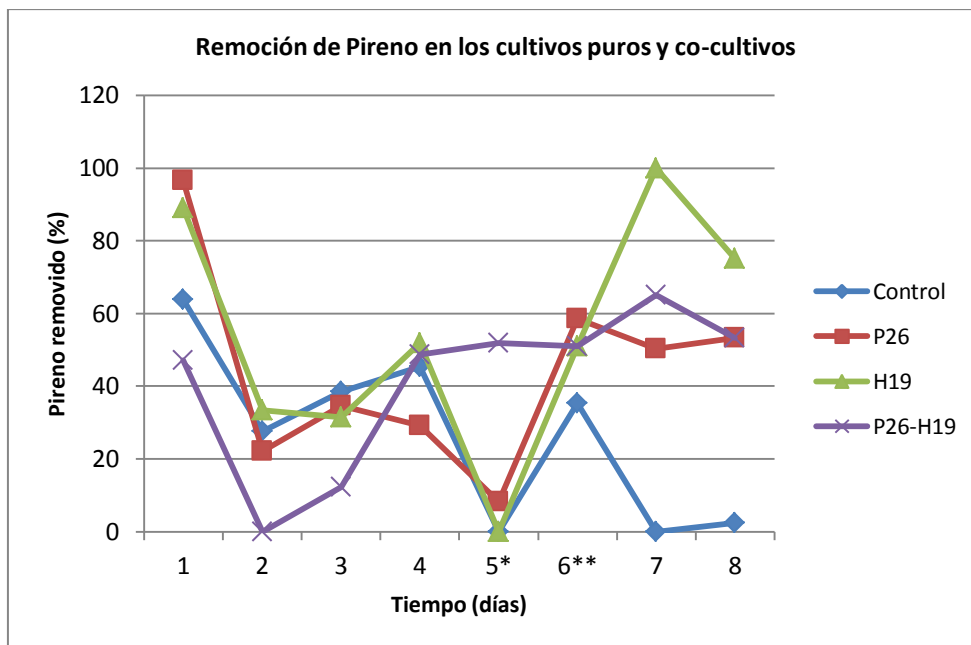


Gráfico 3-9. Remoción de pireno en cultivos puros de P26 y H19, en co-cultivos P26-H19 y en muestras Control (*tratamiento de 72 h para ambas cepas, **tratamiento de 48 h para H19).

Estos gráficos muestran que el porcentaje de remoción de HAPs final alcanzado por los co-cultivos bacterianos (P26-H19) y los cultivos puros es similar. Sin embargo, en los co-cultivos la adaptación del biofilm fue más rápida ya que el porcentaje de remoción de

HAPs comenzó a incrementarse después del segundo día, mientras que en los cultivos puros este proceso comenzó a registrarse a partir del día 5 después del inicio del ensayo.

Una vez transcurrido este lapso de adaptación, la remoción fue aproximadamente la misma en ambos casos, alcanzando un 80% para el acenafteno y entre el 50-60% para el fluoranteno y pireno.

Por otro lado, los gráficos muestran también la disminución de la remoción abiótica (control) a lo largo del tiempo, indicando que el soporte se fue saturando hasta perder la capacidad de absorción de HAPs.

Al-Mailem y colaboradores (2014) evaluaron la remoción de hidrocarburos en biofilms bacterianos diseñados a partir de microbiota presente en aguas residuales. Los sistemas mostraron ser efectivos y se identificaron a *Pseudomonas* y *Gordonia* entre los géneros predominantes en los biofilms. Asimismo, Hassanshahian y colaboradores (2012) reportan a estos géneros como degradadores de hidrocarburos de petróleo en aguas contaminadas.

La habilidad para remover fenantreno y pireno de P26 y H19 en cultivos planctónicos puros ha sido demostrada previamente (Isaac *et al* 2013, Isaac *et al* 2015). Además, distintos estudios muestran la ausencia de inhibición del crecimiento por sustancias antagonistas entre *Gordonia* y *Pseudomonas*, sugiriendo que podrían asociarse en co-cultivos (Isaac *et al* 2015).

Kim y colaboradores mostraron en un estudio de 2009 que cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* y *Stenotrophomonas maltophilia* alcanzan una mayor tasa de degradación de HAPs actuando en un cultivo mixto. En contraste, cuando las cepas se empleaban individualmente la degradación de fenantreno era muy baja, lo que indica que los cultivos mixtos pueden degradar sustancias químicas, incluso si los microorganismos en cultivos puros muestran una baja actividad degradadora.

Macchi y colaboradores (2019) inocularon un consorcio natural degradador de fenantreno con una cepa de *Sphingobium* sp. (*ex Sp. paucimobilis*) con el objetivo de estudiar las interacciones ecológicas de la comunidad bacteriana. La inoculación incrementó la eficiencia de degradación en el consorcio y evitó la acumulación de metabolitos intermedios de fenantreno.

Los tratamientos biológicos han demostrado ser seguros y económicamente convenientes en el proceso de remoción de HAPs del ambiente (Shukla *et al* 2014). Sin embargo, debido a su baja solubilidad, estos compuestos continúan siendo un desafío para la biorremediación. Mangwani y colaboradores (2014) comprobaron una mayor eficiencia de degradación de HAPs en biofilms bacterianos en contraste con células planctónicas. Teniendo en cuenta que estos biofilms se asocian con la presencia de grupos funcionales tensioactivos, la degradación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos es más factible.

Asimismo, un estudio reciente de biorremediación de petróleo en medio líquido (Samhan *et al* 2017) utilizando distintas cepas bacterianas (*P. aeruginosa* entre ellas), tanto libres como inmovilizadas en biosoportes, mostró que luego de 9 semanas las bacterias inmovilizadas removieron una mayor cantidad de hidrocarburos que las células libres, alcanzando un

porcentaje de remoción de 81%. De los cuatro soportes probados, las esponjas (*Phylum Porifera*) fueron las que alojaron una mayor densidad microbiana, mostrando además una mayor actividad bacteriana. Además, se registró que las unidades formadoras de colonias (UFC) se incrementaron gradualmente durante la segunda semana del ensayo, alcanzando un máximo en la tercera semana; la tasa de remoción de petróleo aumentó con el incremento de la actividad del consorcio microbiano y el paso del tiempo.

Al igual que en el presente trabajo, Dosta y colaboradores (2011) identificaron en su estudio de remoción de fenol en reactores biológicos de membrana (MBR) un período de adaptación de la biota a la remoción del contaminante de la carga influente. La planta piloto MBR recibió el efluente industrial alcanzando su capacidad máxima de fenol removido por la biomasa con un tiempo de retención hidráulica (HRT) de 2,8 días. Luego de varios períodos de ensayo, este tiempo se redujo a 0,7 días, mostrando la adaptación de la biomasa hasta lograr su máxima capacidad adaptativa.

3.1.1.2 Cuantificación de biomasa bacteriana

El conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de los cultivos en placas de Petri (Foto 3-1) dio como resultado una disminución notable en el número de UFC de P26 y H19 en el fluido circulante luego del día 5 del ensayo (Gráfico 3-10 y Gráfico 3-11).

Es curioso observar que mientras P26 inmediatamente inició el proceso de inmovilización sobre el soporte, H19 comenzó a hacerlo recién a partir del día 5, manifestándose la capacidad de formar biofilm que posee P26 (Isaac *et al* 2017). La evolución del crecimiento y maduración del biofilm (mayor número de bacterias integrando el biofilm y menos bacterias libres en el fluido) tendría como resultado el aumento de la degradación biológica de HAPs a partir del día 6 del ensayo, tal como se describió en los apartados anteriores.

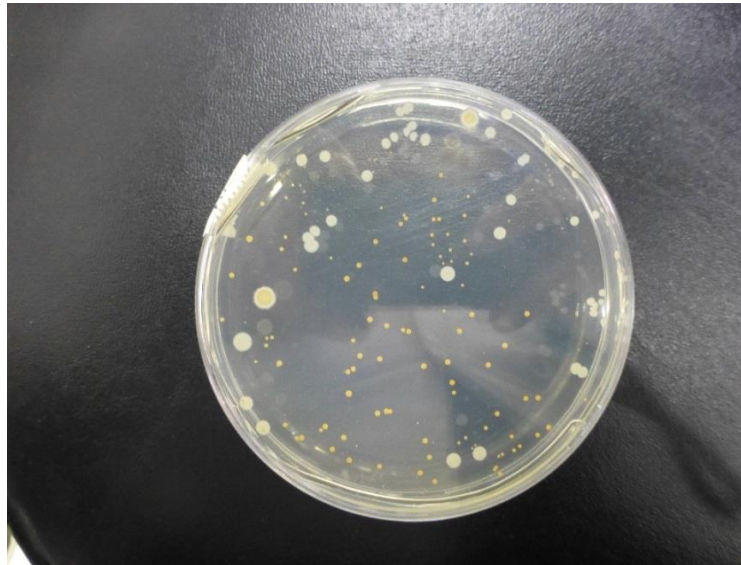


Foto 3-1. Cultivo bacteriano en placas de Petri. Las colonias de color anaranjado pertenecen a H19 y las blanquecinas a P26

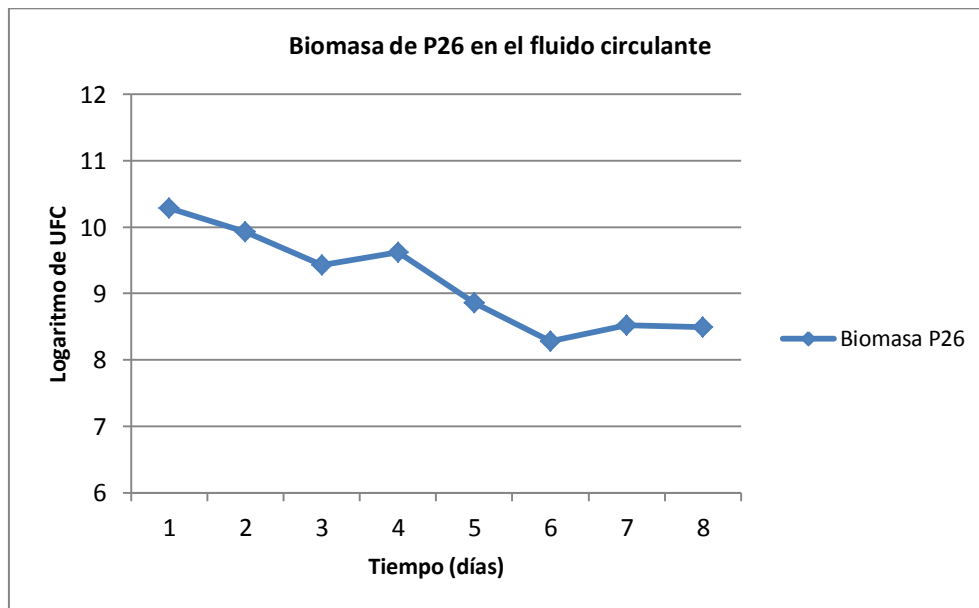


Gráfico 3-10. Variación de la biomasa de P26 en el fluido circulante entre los días 1 y 8 del ensayo

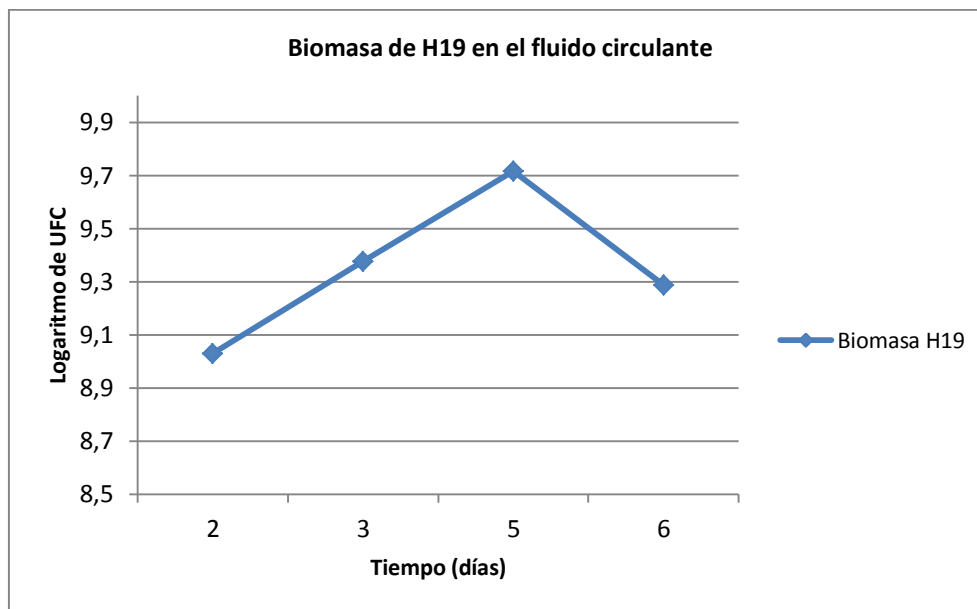


Gráfico 3-11. Variación de la biomasa de H19 en el fluido circulante entre los días 2 y 6 del ensayo

3.1.2 Post tratamiento químico con reactivo de Fenton

A las muestras obtenidas de los reactores (tratamiento biológico) se aplicó posteriormente el proceso Fenton, empleando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hierro (Fe). El tratamiento químico también fue aplicado en las muestras sin pre tratamiento biológico (control).

La remoción de acenafteno medida luego de la aplicación del post-tratamiento químico alcanzó aproximadamente un 100 % tanto en las muestras con cultivos puros (Gráfico 3-12 y Gráfico 3-13) como en las de los co-cultivos P26-H19 (Gráfico 3-18).

La remoción de fluoranteno y pireno alcanzó aproximadamente entre un 80 y un 100 % en las muestras con cultivos puros (Gráfico 3-14, Gráfico 3-15, Gráfico 3-16, Gráfico 3-17) y fue más cercana al 100 % en el caso de los co-cultivos P26-H19 (Gráfico 3-19 y Gráfico 3-20).

Al igual que en las muestras que experimentaron tratamiento biológico, la remoción de acenafteno en las muestras Control fue cercana al 100 %, mientras que la de fluoranteno y pireno alcanzó aproximadamente entre un 70 y un 100 %.

Remoción de HAPs en cultivos puros con post tratamiento Fenton

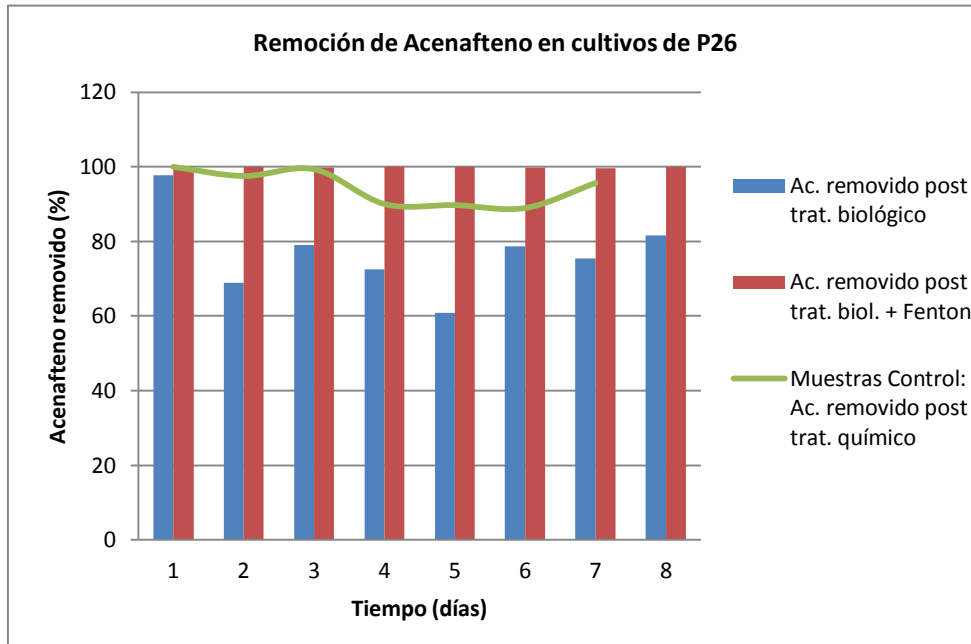


Gráfico 3-12. Acenafteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26), b) tratamiento biológico (P26) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

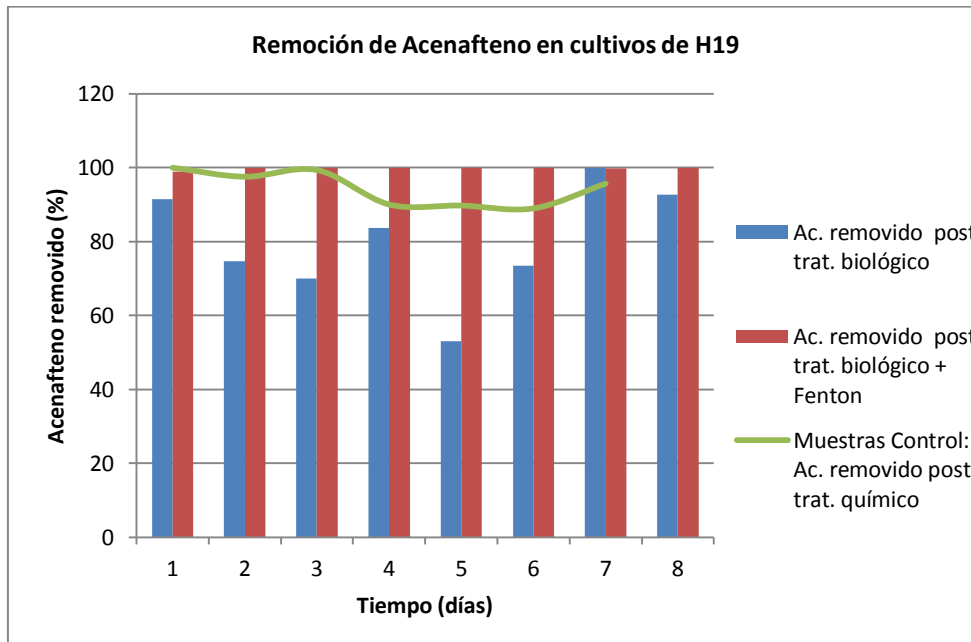


Gráfico 3-13. Acenafteno removido luego de a) tratamiento biológico (H19), b) tratamiento biológico (H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

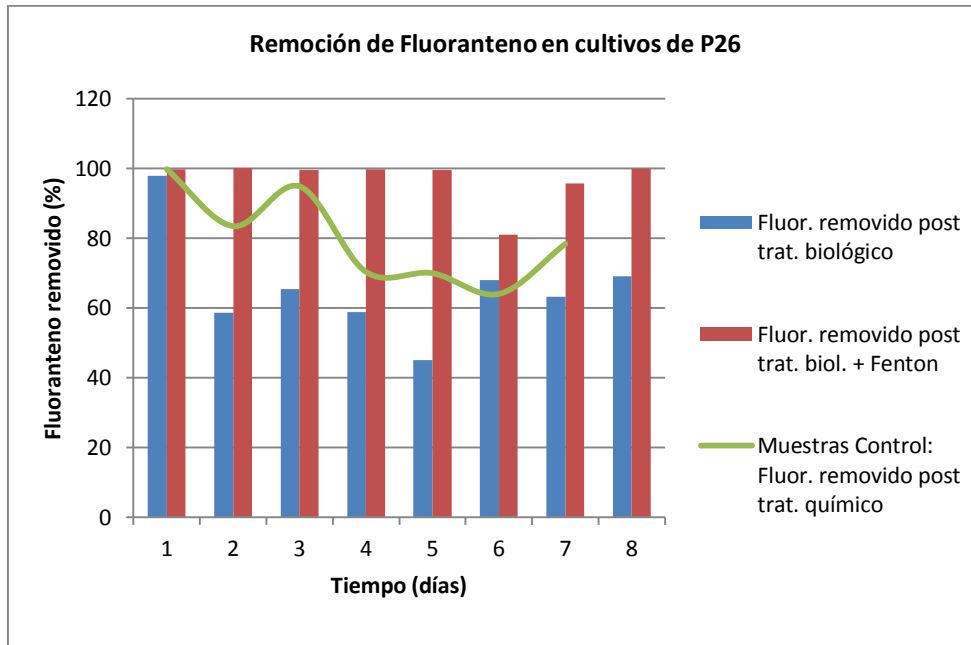


Gráfico 3-14. Fluoranteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26), b) tratamiento biológico (P26) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

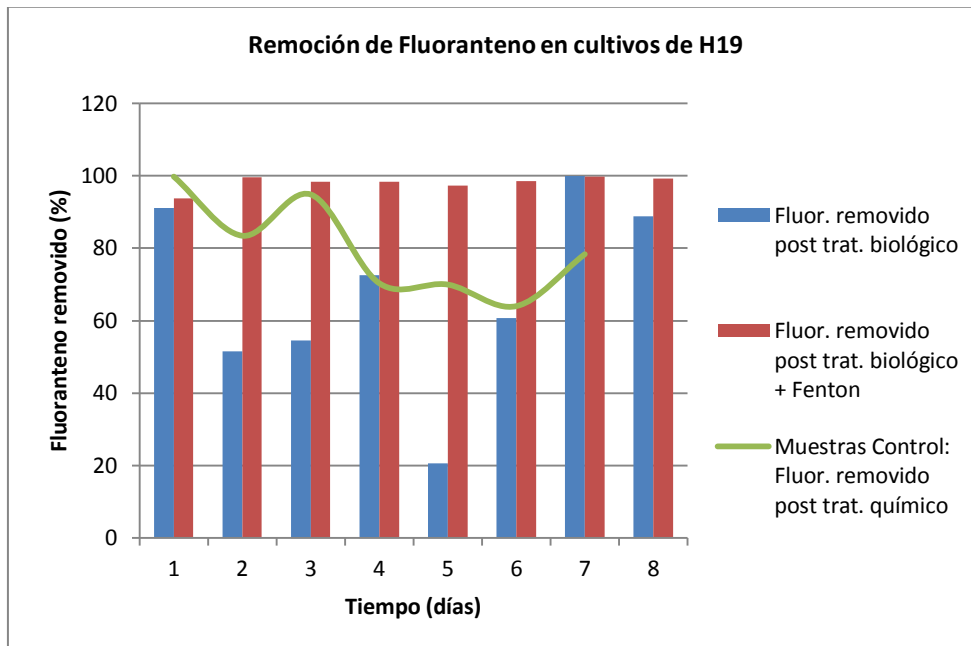


Gráfico 3-15. Fluoranteno removido luego de a) tratamiento biológico (H19), b) tratamiento biológico (H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

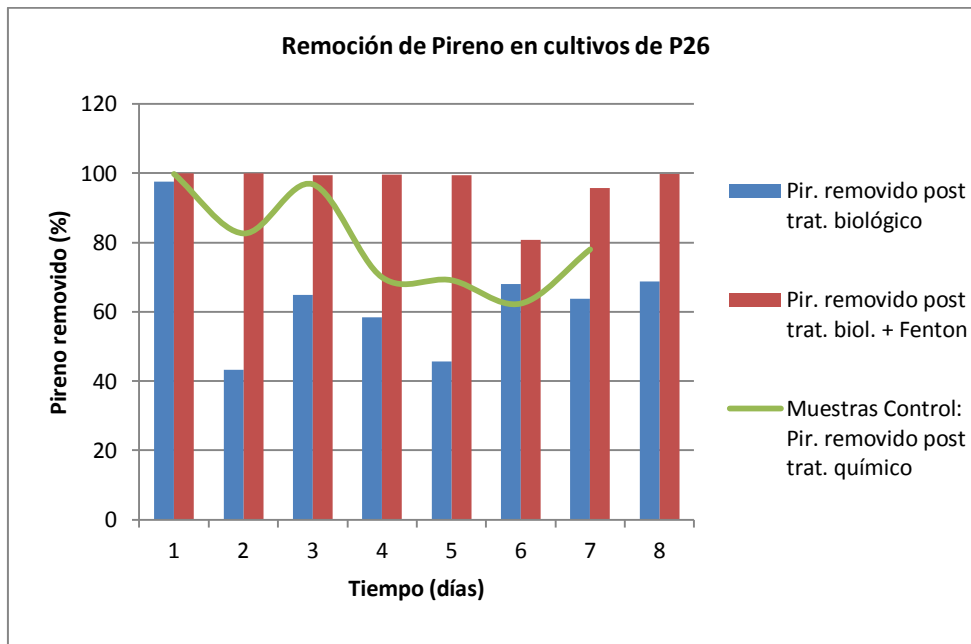


Gráfico 3-16. Pireno removido luego de a) tratamiento biológico (P26), b) tratamiento biológico (P26) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

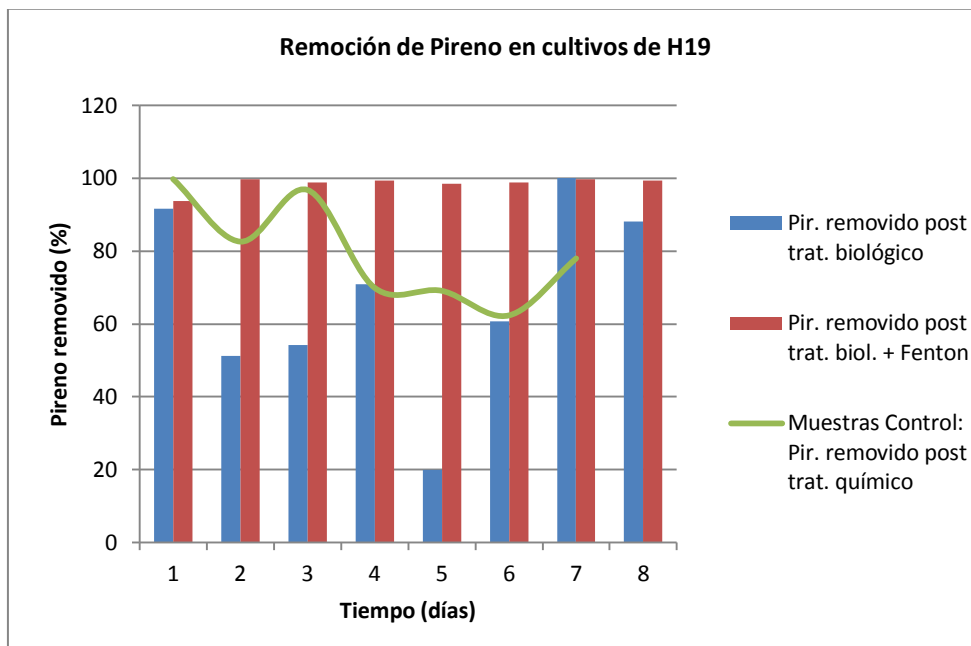


Gráfico 3-17. Pireno removido luego de a) tratamiento biológico (H19), b) tratamiento biológico (H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

Remoción de HAPs en co-cultivos (P26-H19) con post tratamiento Fenton

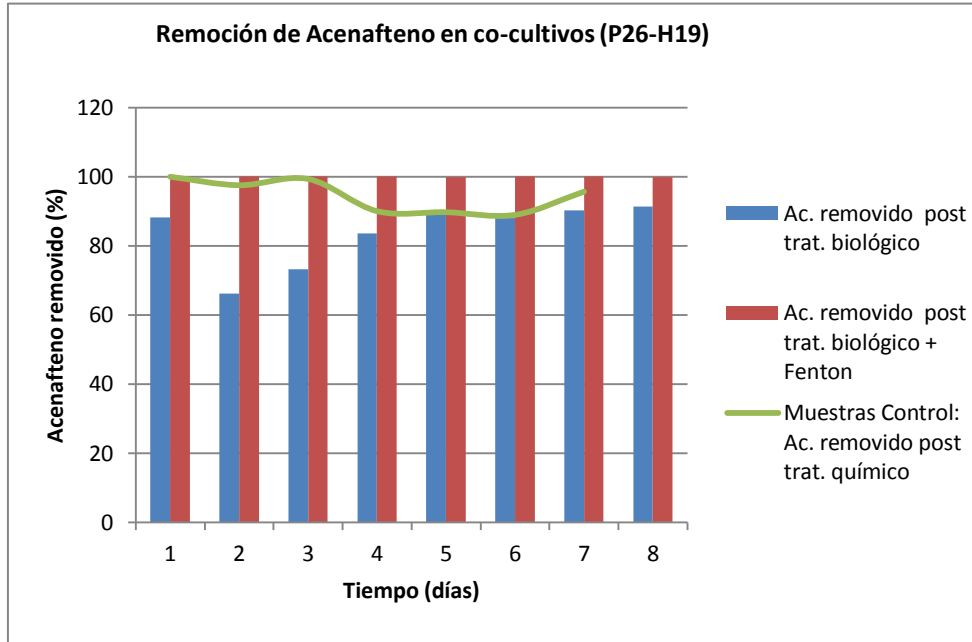


Gráfico 3-18. Acenafteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26-H19), b) tratamiento biológico (P26-H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

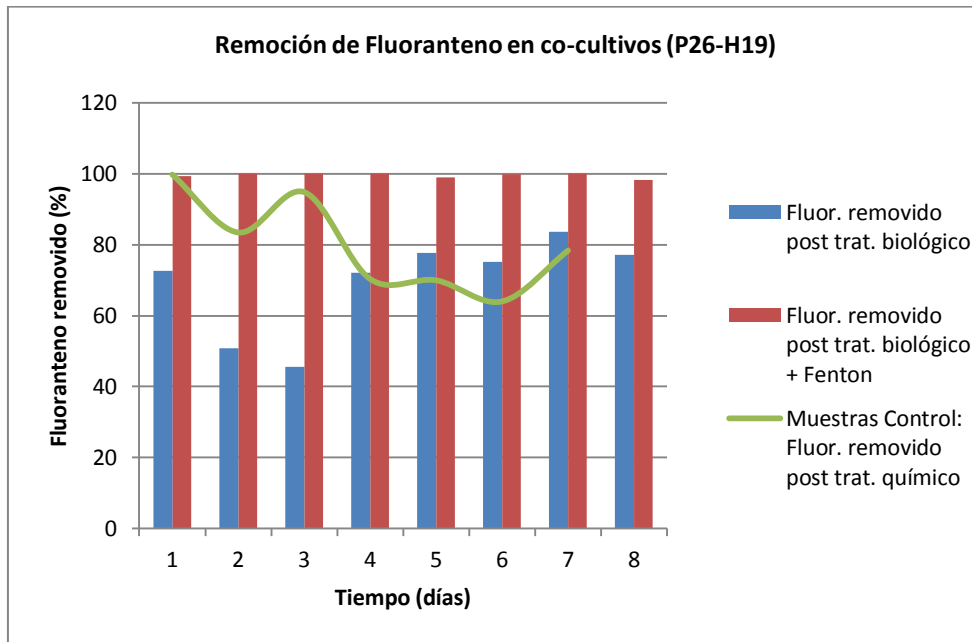


Gráfico 3-19. Fluoranteno removido luego de a) tratamiento biológico (P26-H19), b) tratamiento biológico (P26-H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

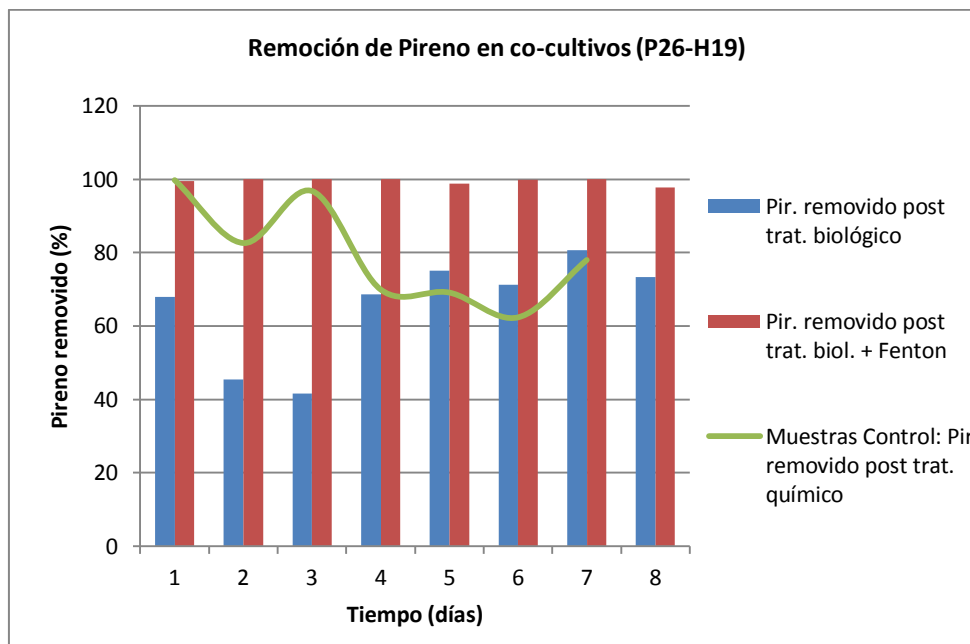


Gráfico 3-20. Pireno removido luego de a) tratamiento biológico (P26-H19), b) tratamiento biológico (P26-H19) seguido del tratamiento químico y c) en muestras Control luego del tratamiento químico (sin pre tratamiento biológico). (Error del 5 %)

Los resultados muestran que el tratamiento Fenton aplicado fue efectivo en la remoción de los HAPs residuales (remanentes post tratamiento biológico) en todos los casos, alcanzando un porcentaje aproximado del 100 %. Estableciendo una comparación con el tratamiento biológico, el mismo logró una remoción de aproximadamente el 80% para el acenafteno y entre el 50-60% para el fluoranteno y pireno.

Si bien el tratamiento químico mostró ser efectivo por sí solo (muestras control), la remoción de HAPs fue notablemente mayor cuando se aplicaron los tratamientos biológicos y químicos combinados. En el caso de los co-cultivos se observó que luego del cuarto día (período de adaptación del biofilm) la remoción biológica de HAPs fue prácticamente igual, o incluso mayor, a la remoción química alcanzada en las muestras control.

Los tratamientos biológico y químico mostraron una eficacia de remoción similar cuando fueron aplicados individualmente, por lo que para lograr una remoción completa de HAPs sería necesaria la aplicación de los tratamientos combinados.

3.1.2.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en ensayos con cultivos puros y mixtos

La eficiencia de los tratamientos biológicos y químico combinados se determinó mediante el cálculo de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en las muestras control, en los cultivos puros y en los co-cultivos, luego de la aplicación del tratamiento biológico (antes de Fenton) y después del tratamiento químico de Fenton.

En cultivos con P26, el tratamiento químico logró disminuciones de la DQO entre el 36 y el 94 % aproximadamente (Gráfico 3-22).

En las muestras con cultivos puros de H19 prácticamente no se registró diferencia en la DQO luego del tratamiento con reactivo de Fenton, evidenciándose solo una muy leve baja en los días 4 y 8 del tratamiento (Gráfico 3-23). Esto podría deberse a la importante disminución de DQO ya producida por el tratamiento biológico con H19.

En el caso de las muestras con el co-cultivo (P26-H19) la disminución de la DQO luego del tratamiento Fenton fue de aproximadamente entre un 10 y un 96 %. (Gráfico 3-24).

En la muestra T0 con la mezcla de hidrocarburos, la DQO disminuyó en un 60 % luego del tratamiento Fenton.

Por último, en las muestras Control la disminución de la DQO luego del tratamiento con Fenton fue de entre el 20 y el 100 % aproximadamente (Gráfico 3-21), lo que muestra que el tratamiento químico por sí solo fue eficaz.

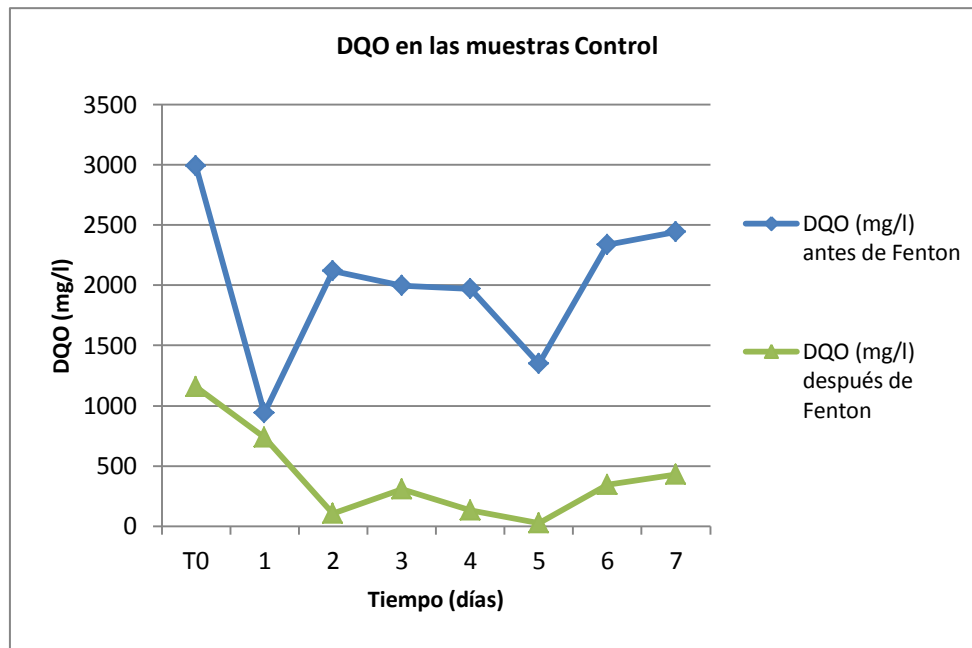


Gráfico 3-21. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en las muestras Control antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)

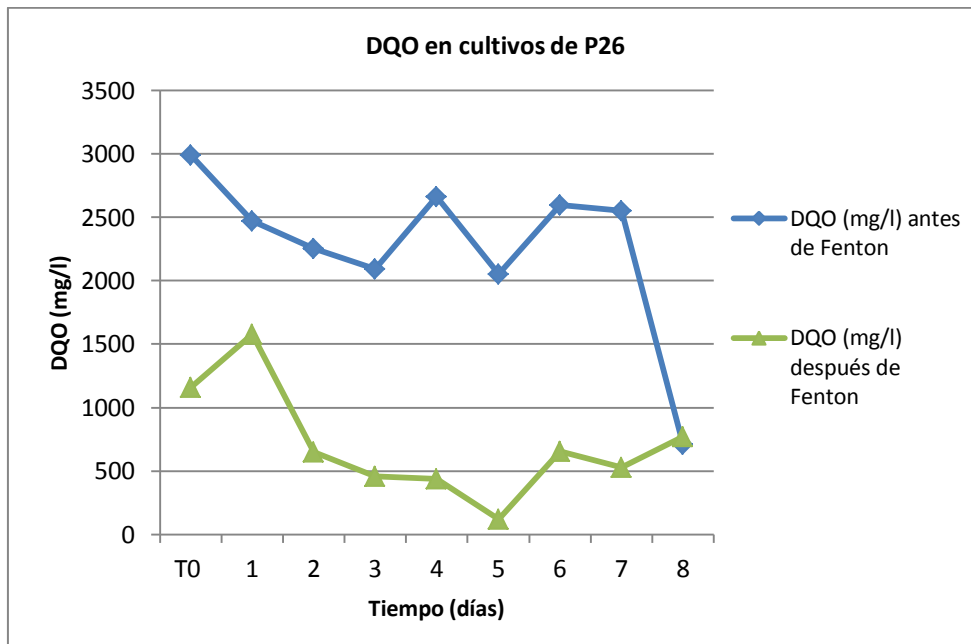


Gráfico 3-22. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestras con cultivos puros de P26 (tratamiento biológico) antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)

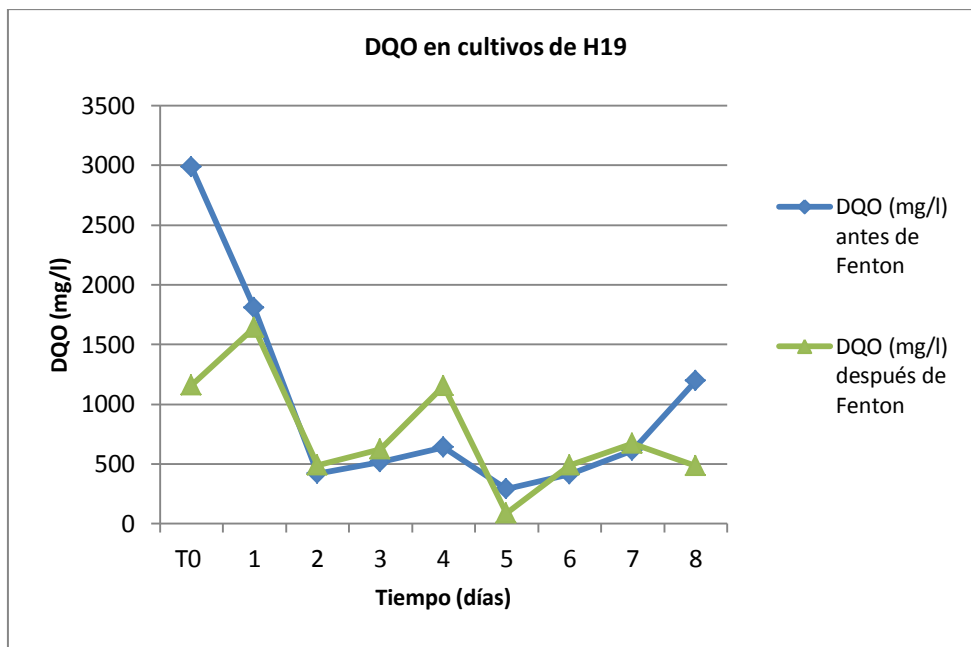


Gráfico 3-23. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestras con cultivos puros de H19 (tratamiento biológico) antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)

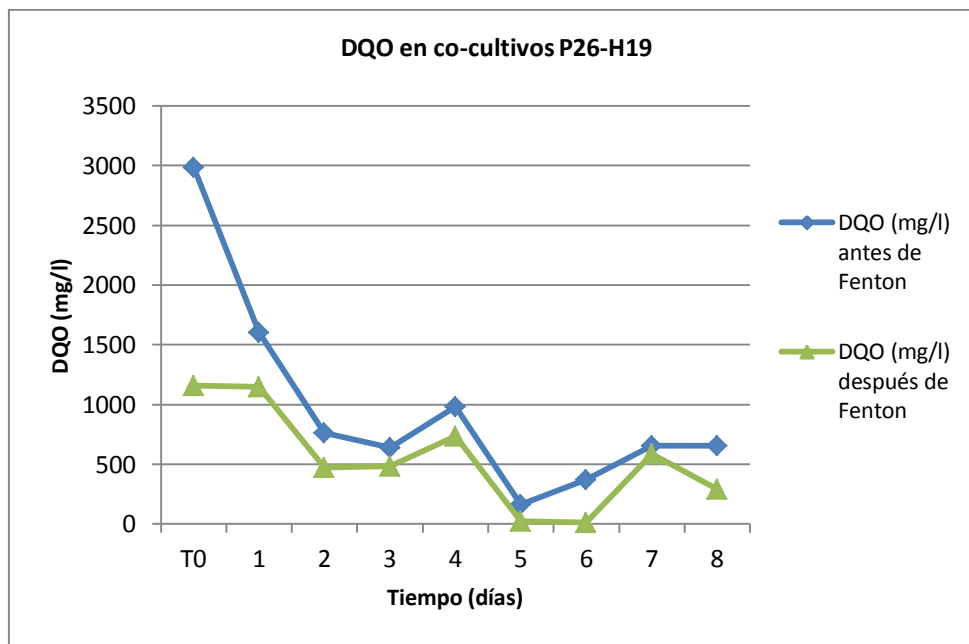


Gráfico 3-24. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestras con co-cultivos P26-H19 (tratamiento biológico) antes y después del tratamiento químico con reactivo de Fenton. (Error del 5 %)

El tratamiento con reactivo de Fenton es una alternativa prometedora para la remediación de aguas residuales. La reacción de Fenton puede llevarse a cabo a temperatura ambiente y presión normal y presenta una alta performance y baja toxicidad (el H_2O_2 se transforma en H_2O y O_2). Sin embargo, existen algunas limitaciones con respecto al proceso, incluyendo los costos relativamente altos de los reactivos y el volumen elevado de Fe que se utiliza.

Varios catalizadores incluyendo Fe^{3+} , Cu^{2+}/Cu^+ , pirita y nano hierro cerovalente han sido usados para reemplazar el Fe^{2+} y así incrementar la eficiencia. Además, procesos Fenton modificados han sido desarrollados combinando la oxidación clásica Fenton con métodos físicos como radiación UV, ultrasonido o microondas. Recientemente tecnologías Fenton modificadas (Bautista *et al* 2008, Jiang *et al* 2010) han sido ampliamente usadas debido a su alta adaptación y capacidad degradativa, las cuales han sido revisadas por algunos autores (Bautista *et al* 2008, Wang *et al.* 2016).

La combinación de procesos Fenton y tratamientos biológicos se ha desarrollado para superar los defectos de la tecnología Fenton (por ej, alto consumo de reactivos y reacciones drásticas, etc.) o las limitaciones de los tratamientos biológicos (por ej., condiciones estrictas para las reacciones y largos períodos de tiempo, etc.). Esta combinación ha sido usada en el tratamiento de aguas residuales (Sirtori *et al* 2009).

Ren y colaboradores (2020) combinaron tratamientos Fenton con tratamientos biológicos, aeróbicos y anaeróbicos, para la remoción de perileno (HAP de cinco anillos) de aguas residuales. En este estudio se testeó la aplicación del tratamiento químico antes del tratamiento biológico y entre dos tratamientos biológicos, resultando esta última la opción más efectiva. *Pseudomonas* fue uno de los tres géneros dominantes identificados en los reactores.

Mandal y colaboradores (2010) aplicaron tratamientos químicos y biológicos individualmente y combinados para la degradación de contaminantes en aguas residuales de curtiembres. El tratamiento con reactivo de Fenton durante 30 minutos seguido de 72 horas de tratamiento biológico empleando *Thiobacillus ferrooxidans*, resultó la alternativa más eficiente, alcanzándose valores de remoción de DQO (Demanda Química de Oxígeno) de 93%, DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) de 98%, Sulfuro de 72%, Cromo de 62% y color de 100%.

3.2 SUELO

3.2.1 Remoción de petróleo: bioaumentación y tratamiento con reactivo de Fenton

La cuantificación del petróleo remanente (post tratamiento) extraído de los microcosmos de suelo no estéril arrojó los siguientes resultados:

Tratamiento de 21 días

Los microcosmos que fueron inoculados con las cepas P26 y H19 (bioaumentación) mostraron una remoción de petróleo del 16,6 % luego del tratamiento biológico, a los 21 días, y una remoción del 32,8 % luego de la aplicación del tratamiento químico secundario (Fenton).

Los microcosmos control, que experimentaron atenuación natural, no evidenciaron remoción de petróleo luego de 21 días. Luego de la aplicación del tratamiento químico secundario (Fenton) se registró una remoción del 6,5 %.

La concentración de petróleo remanente post tratamiento (gramos de petróleo en gramos de suelo en %) en cada caso se muestra en el Gráfico 3-25.

Tratamiento de 33 días

Los microcosmos que fueron inoculados con las cepas P26 y H19 (bioaumentación) mostraron una remoción de petróleo del 32,7 % luego del tratamiento biológico, medido a los 33 días. En los microcosmos que se aplicó el tratamiento químico secundario (Fenton) a los 21 días y se extrajo el petróleo remanente a los 33 días, la remoción fue del 60,9 %.

Los microcosmos control, que experimentaron atenuación natural, mostraron una remoción del 18,25 % luego de 33 días, y una remoción del 38,5% al final del tratamiento luego de la aplicación del tratamiento químico secundario (Fenton) a los 21 días.

La concentración de petróleo remanente post tratamiento (gramos de petróleo en gramos de suelo en %) en cada caso se muestra en el Gráfico 3-26.

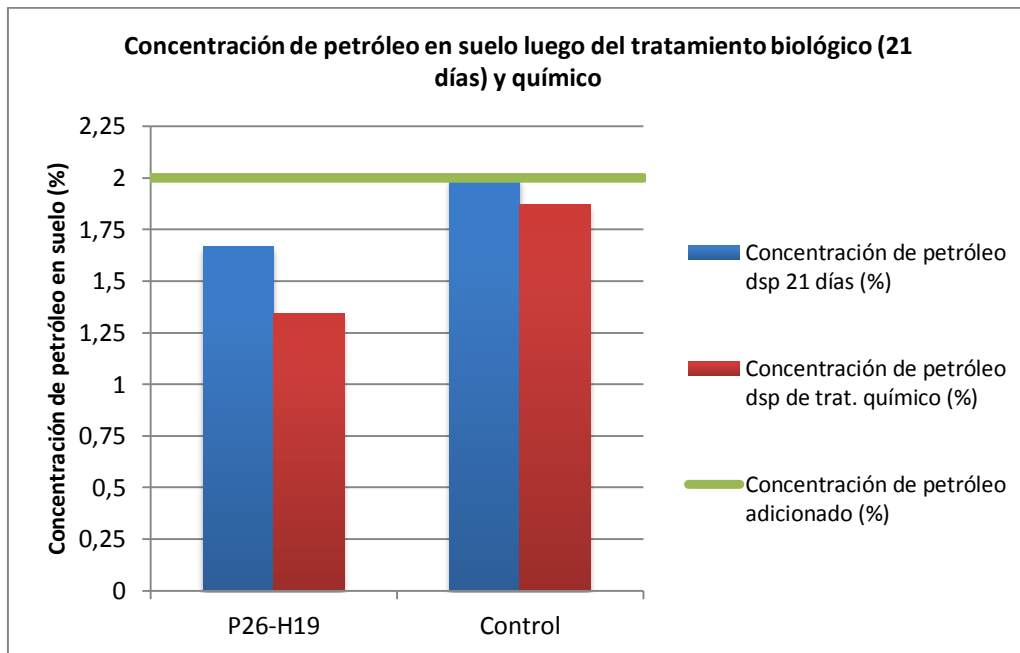


Gráfico 3-25. Concentración de petróleo en el suelo luego de la aplicación del tratamiento biológico (21 días) y químico. La concentración de petróleo adicionada/inicial fue de un 2 % (línea verde). (Las desviaciones estándar no superan el 5 %)

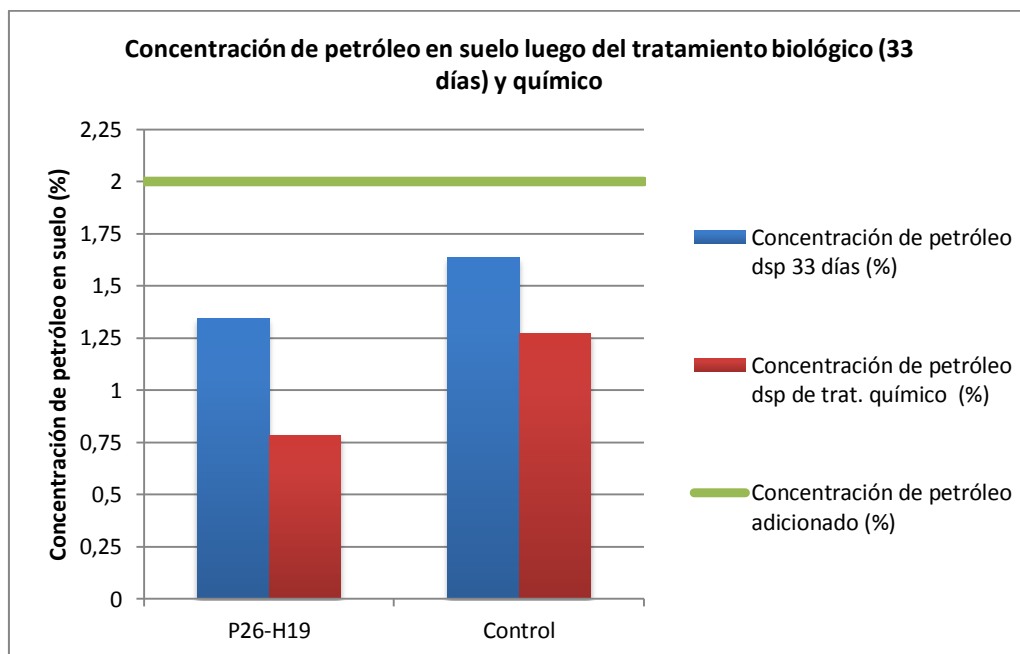


Gráfico 3-26. Concentración de petróleo en el suelo luego de la aplicación del tratamiento biológico (33 días) y químico. La concentración de petróleo adicionada/inicial fue de un 2 % (línea verde). (Las desviaciones estándar no superan el 5 %)

En ambos tratamientos (21 y 33 días) se registró un porcentaje más elevado de remoción de petróleo (tanto antes como después del tratamiento químico) en los microcosmos a los que

se les aplicó un tratamiento de bioaumentación (inoculados con P26 y H19) en relación a aquellos que experimentaron atenuación natural. El tratamiento de bioaumentación con una duración de 33 días produjo casi el doble de remoción de petróleo (un 97 % más) que el aplicado por 21 días.

Por otra parte, los resultados muestran que las bacterias continúan degradando el petróleo luego de la aplicación del tratamiento químico. La remoción de petróleo luego del tratamiento químico practicado a los 21 días en los microcosmos con bioaumentación fue de 32,8 % mientras que la remoción de petróleo medida a los 33 días, luego del tratamiento químico a los 21 días, fue de 60,9 %. Esto demuestra que el tratamiento químico estimula la biodegradación, posiblemente porque degrada compuestos del petróleo complejos remanentes (algunos de ellos tóxicos) haciendo disponibles de esta manera los simples para su biodegradación; porque agrega oxígeno y agua al sistema para la degradación aeróbica; o porque hace al hidrocarburo más biodisponible físicamente.

Si bien los tratamientos combinados (bioaumentación y tratamiento químico) mostraron un porcentaje de remoción mayor en menos tiempo, en relación al tratamiento biológico únicamente (60,9 % a los 33 días en tratamientos combinados versus 32,7 % a los 33 días de tratamiento biológico), se observó que los porcentajes de remoción alcanzados aplicando un tratamiento combinado en 21 días y un tratamiento de bioaumentación con una duración de 33 días son similares (aproximadamente 32 %).

La actividad microbiana del suelo depende, entre otros factores, de la temperatura, aireación y condiciones de humedad, cantidad y disponibilidad de nutrientes y de la competencia y antagonismos que se establecen entre los propios grupos de microorganismos (Méndez Cabezas 2013). La suplementación con nutrientes se ha propuesto como una estrategia para optimizar la tasa de degradación de hidrocarburos por parte de microorganismos nativos y exógenos involucrados en procesos de biorremediación (Juárez Tomás *et al* 2019). En este estudio se utilizó el agua de maceración de maíz, un subproducto de la molienda del maíz, como una fuente de bajo costo de distintos nutrientes (proteínas, aminoácidos, vitaminas, carbohidratos, ácidos orgánicos y minerales) para estimular el crecimiento y actividad degradadora de los microorganismos presentes/inoculados en los microcosmos.

Recientemente, distintos estudios han comparado la eficacia de diferentes tratamientos de biorremediación, incluyendo la atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación de sitios contaminados con hidrocarburos de petróleo. El hallazgo general ha sido que el bioaumentación en combinación con la bioestimulación usualmente provee velocidades mayores de biorremediación que la bioestimulación por sí sola, testeado con una variedad de contaminantes hidrocarbonados en un amplio rango de condiciones (Shahsavari *et al* 2017). Por otro lado, existe variada evidencia de la superioridad de *Pseudomonas* en la biodegradación de petróleo crudo, en relación a otras cepas bacterianas. Esto puede deberse a su diversidad metabólica, abundancia en comunidades microbianas y resistencia a oxidantes químicos (Samhan *et al* 2017).

Varios estudios han investigado la posibilidad del bioaumentación con consorcios degradadores de HAPs o cepa puras en suelos contaminados con HAPs y se ha comprobado de este modo el incremento en la degradación de estos hidrocarburos en lodos y en microcosmos de suelo (Grosser *et al* 1991, Madsen y Kristensen 1997, Kästner *et al* 1998). Sin embargo, Johnsen *et al* (2005) plantean que el incremento en la biodegradación de HAPs en experimentos a gran escala como resultado de la inoculación con bacterias degradadoras de HAPs (de laboratorio) no ha sido demostrado. Puede especularse que muchas de las fallas ocurridas en la aplicación del bioaumentación en los primeros años de la técnica se debieron a la falta de atención en los principios de la degradación de HAPs. Este descuido también incluye el foco en la capacidad bioquímica intrínseca de los inóculos sin considerar sus características fisicoquímicas y su capacidad para colonizar el suelo.

El bioaumentación debe ser más que solo la adición de una función metabólica. La biodisponibilidad de los contaminantes puede influir cuando los métodos de aplicación incluyen homogeneización, mezcla o flujo intensivo del sistema o cuando las bacterias adicionadas difieren de la población indígena con respecto a su afinidad específica por el contaminante, la habilidad de utilizar co-sustratos naturales, la movilidad activa o pasiva, el comportamiento de adherencia, o la habilidad de producir surfactantes o de captar sustancias químicas solubilizadas por surfactantes. La biodisponibilidad puede también verse afectada cuando la información genética responsable de la actividad degradativa de las bacterias introducidas se transfiere a bacterias indígenas receptoras que se desvían de las características mencionadas (Johnsen *et al* 2005).

En el suelo los HAPs se distribuyen de manera heterogénea y pueden estar absorbidos dentro de partículas orgánicas, ubicados en poros pequeños que son inaccesibles a las bacterias u ocluidos por los constituyentes sólidos del suelo. Los HAPs se disponen típicamente como gotas con una baja relación superficie volumen, lo que limita el acceso de las bacterias. La mezcla no ocurre en el suelo y la difusión efectiva de las moléculas puede ser de menos órdenes de magnitud que en el agua teniendo en cuenta que la difusión se ve retardada por la fase sólida y por lo tortuoso del sistema. Por lo tanto, se prevé que una amplia fracción de las bacterias degradadoras de HAPs en el suelo está físicamente separada de las fuentes de HAPs y depende del transporte de estas sustancias por difusión desde las fuentes de HAPs hacia las células (Harms y Bosma 1997).

A diferencia de los sistemas acuosos, en el suelo el consumo de sustrato lleva más rápidamente a condiciones límite de transferencia de masa a medida que se incrementa el número de células. Por lo tanto, las poblaciones degradadoras de HAPs en suelo no crecen mayormente sino que están en una fase pseudo-estacionaria donde un crecimiento transitorio solo reemplaza las células perdidas hasta que la capacidad de transferencia de masa controlada del hábitat es alcanzada nuevamente. Los estudios en laboratorio con cultivos puros degradadores de HAPs utilizan mayormente HAPs en altas concentraciones; este no es un escenario realista en el suelo ya que se cree que las bacterias están generalmente en condiciones de deficiencia de carbono y energía. En el suelo, las bacterias podrán no utilizar una única fuente de carbono sino más bien co-utilizar un número de compuestos de carbono disponibles (Egli 1995, 2002). Si las células utilizan varias fuentes de carbono concomitantemente para mantener su biomasa, no necesariamente habrá un

umbral de concentración de HAPs por debajo del cual se detenga la biodegradación (Johnsen *et al* 2005).

La oxidación Fenton y los tratamientos biológicos han sido bien considerados como métodos de remediación. Sin embargo, existen efectos químicos no deseados en el suelo resultantes de la reacción de Fenton y en muchos casos el tratamiento biológico no ha podido remover contaminantes altamente tóxicos de manera eficiente (Neyens y Baeyens 2003, Sarkar *et al* 2005, Yap *et al* 2011).

Con el tiempo se han desarrollado métodos combinados mostrando eficiencias mayores en comparación con los tratamientos individuales. Los métodos combinados usualmente han sido empleados para remover hidrocarburos de petróleo de suelos contaminados. En India, investigadores encontraron que el 57% de la fracción alifática (C14-C28) fue removida en un proceso Fenton y la tasa de remoción alcanzó el 75% después del tratamiento con *Fusarium solani*, mientras que el tratamiento biológico individualmente solo alcanzó el 61% de remoción (Buragohain *et al.* 2013). Jho y colaboradores (2013) usaron el proceso Fenton y el bioaumentación para la remediación exitosa de hidrocarburos totales de petróleo en suelo.

Goi y colaboradores (2006) encontraron que un proceso químico similar a Fenton y la bioestimulación fueron efectivos en la remediación de suelo contaminado, alcanzando la remoción de petróleo el 74%. También se observó una remoción de HTP del 88.9% en suelos contaminados con petróleo usando métodos combinados de Fenton y bioestimulación (Gong 2012). En ese estudio la cantidad y actividad de microorganismos indígenas se incrementó en el proceso Fenton de modo tal que la tasa de remoción total de HTP luego del tratamiento combinado fue mucho mayor que en el tratamiento biológico sin el pretratamiento con Fenton.

Los tratamientos Fenton combinados con los biológicos fueron usados también para la degradación de HAPs. Rafin y colaboradores (2009) encontraron que la eficiencia de degradación de Benzo[a]pireno se incrementa entre la mitad y dos veces respectivamente comparando la oxidación Fenton y el biotratamiento (con *Fusarium solani*) por separado.

El compostaje, por su parte, se ha usado para el tratamiento de residuos sólidos pero en algunos casos se ha visto que necesita un tratamiento ulterior. Lu y colaboradores (2010) llevaron a cabo un estudio de laboratorio usando procesos químicos similares a Fenton y tratamiento biológico para remediar suelo contaminado con petróleo, luego del compostaje. Al final del proceso Fenton, la tasa de remoción de materia orgánica extraíble con diclorometano (TEO) fue de 32.7%. El tratamiento biológico consecutivo removió 17.9% de TEO y los análisis de toxicidad mostraron que la misma había disminuido claramente.

4 CONCLUSIONES

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) están presentes como contaminantes en el agua, aire y suelo y son compuestos usuales en colorantes, pesticidas y plásticos. La persistencia de estos contaminantes orgánicos en el ambiente es preocupante y merece particular atención. Debido a su naturaleza hidrofóbica y a su baja solubilidad, los HAPs son resistentes a la biodegradación y pueden bioacumularse en el ambiente a lo largo de la cadena alimentaria, es por esto que representan una amenaza a largo plazo para la salud humana.

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de sistemas de tratamiento biológico y químico para la remoción y degradación de hidrocarburos aromáticos del petróleo, que consistieron en la utilización de biomasa bacteriana de *Pseudomonas monteilii* P26 y *Gordonia sp.* H19 inmovilizada en un soporte inerte, o de su inoculación en un sistema de suelo contaminado artificialmente.

Los resultados del trabajo confirmaron las hipótesis formuladas y permitieron la elaboración de las siguientes conclusiones:

Hipótesis 1: La aplicación de tratamientos biológicos y químicos combinados para la remoción de hidrocarburos de petróleo en matrices contaminadas artificialmente es más eficiente que la aplicación de los mismos tratamientos aplicados individualmente.

Hipótesis confirmada

En medio líquido:

- Los resultados obtenidos luego de la aplicación de un tratamiento de oxidación química con reactivo de Fenton a las muestras obtenidas de los reactores, demostraron que el tratamiento químico fue efectivo en todos los casos, lográndose una remoción casi completa de HAPs de las muestras.
- El porcentaje de remoción alcanzado en los reactores con biomasa inmovilizada por cultivos puros y co-cultivos fue similar, sin embargo el período de adaptación del biofilm para alcanzar su máxima actividad fue más breve (menos de la mitad) en los co-cultivos.

En microcosmos de suelo:

- Si bien la combinación de un tratamiento biológico seguido de un tratamiento químico fue más efectiva en menos tiempo, en relación al tratamiento biológico aplicado únicamente, la remoción de petróleo alcanzada en el tratamiento biológico más prolongado mostró un porcentaje similar de remoción que el producido por los tratamientos combinados de período más corto. Esto muestra que el tiempo es una variable clave en la evaluación de la efectividad de los tratamientos biológicos que deberá ser sopesada en la toma de decisiones respecto de la selección de un tratamiento de remediación ambiental y su costo-beneficio.

Hipótesis 2: El tratamiento de bioaumentación para la remoción de petróleo en microcosmos de suelo contaminado artificialmente es más efectivo que la atenuación natural.

Hipótesis confirmada

- El bioaumentación con biomasa bacteriana de *Pseudomonas monteilii* P26 y *Gordonia* sp. H19, en los sistemas de suelo contaminado artificialmente mostró ser más efectivo que la atenuación natural en la remoción de petróleo, resultando además muy superior el porcentaje removido en el tratamiento más prolongado (32,7 % versus 18,25 % en los microcosmos control).
- En cuanto al tratamiento químico en suelo, este fue efectivo en todos los casos (60,9 % de remoción en microcosmos inoculados y 38,5 % en microcosmos control, en el tratamiento más prolongado). Las bacterias continuaron degradando el petróleo luego de la aplicación de oxidación química lo que demuestra una vez más que el tratamiento Fenton favorece la biodegradación, a través del incremento en la biodisponibilidad de los hidrocarburos de diversa manera.

Conclusiones generales:

- En cuanto a la actividad biodegradadora en las matrices evaluadas, la remoción bacteriana de hidrocarburos fue mayor en los reactores de biomasa inmovilizada (50-80 %) que en los microcosmos de suelo (32,7 %). De todos modos estos no son sistemas que puedan compararse ya que intervienen muchos factores, físicos y químicos, que influyen en la disponibilidad de nutrientes e hidrocarburos en ambas matrices: líquida y sólida.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que los tratamientos propuestos tanto para suelos como aguas pueden ser viables, aunque sería necesaria la ejecución de ensayos a una escala mayor.

El desarrollo de estrategias de remediación eficientes requiere del conocimiento de los parámetros ambientales y funcionamiento metabólico que rigen a un consorcio microbiano. El uso de consorcios nativos para remediar suelos contaminados con HAPs muestra un gran potencial para su uso en la biorremediación. La exposición prolongada de los consorcios a los HAPs los hace más eficientes para degradar el contaminante como única fuente de carbono. En cuanto a los consorcios preparados en laboratorio existen ventajas y desventajas; una ventaja es que pueden formarse consorcios con cinéticas de degradación más eficientes y que toleran concentraciones más altas de contaminante. Una gran desventaja de los consorcios preparados es la dificultad para formarlos y que estos convivan de manera armoniosa sin competir por el sustrato y el espacio. No obstante, en el estudio de los consorcios se observa que aún hay parámetros no establecidos que limitan la biodegradación del contaminante.

Por otra parte, el escalado de la biorremediación en el campo no ha logrado satisfacer, en ocasiones, las expectativas deseadas. En instancias recientes ha habido ejemplos de una biorremediación efectiva en campo combinando el bioaumentación con alguna forma de bioestimulación. Recientes desarrollos en microbiología ambiental, particularmente la secuenciación de segunda generación (*Next Generation Sequencing*), jugarán un rol clave fortaleciendo el futuro comercial de las tecnologías de biorremediación.

El potencial de los procesos microbiológicos para la biorremediación y biodegradación de compuestos tóxicos y/o xenobióticos es alto, y a pesar de los altos costos de muchos procesos, existe un continuo interés industrial evidenciado por el creciente número de patentes relativo al género *Gordonia*, entre otros. Sin duda, las capacidades metabólicas de estas especies continuarán atrayendo el interés de la industria química biotecnológica y nuevas aplicaciones serán identificadas y exploradas. Vale remarcar que algunos miembros del género son patógenos oportunistas, como así también ocurre en el género *Pseudomonas*, por lo que se restringiría el uso de estas bacterias.

La biología del suelo es considerada internacionalmente un campo “frontera” en el avance de la ciencia. En la Argentina el área requiere mayor esfuerzo de investigación en cantidad y calidad, no solo en campos considerados de avanzada, como el conocimiento de la genómica de los microorganismos del suelo, sino también en aplicaciones biotecnológicas, como la biorremediación de suelos contaminados, o la fijación de nitrógeno atmosférico.

Se hace necesario el estudio detallado de las características particulares de las diferentes tecnologías de remediación para evaluar de qué modo estas favorecen o limitan la eficiencia global del proceso. Un aspecto clave en la aplicación de sistemas combinados de tratamiento biológico y químico de contaminantes es el abordaje de estudios económicos exhaustivos que puedan presentar esta innovadora tecnología como una estrategia competitiva y costo-efectiva.

En el futuro los avances en biología y biorremediación tendrán un rol fundamental en la promoción de la prestación de servicios ecosistémicos por los suelos y el agua, sin duda una de las demandas del milenio.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Alessandrello, M. J., Parellada, E. A., Tomás, M. S. J., Neske, A., Vullo, D. L., & Ferrero, M. A. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using annonaceous acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 189-195.
- Alessandrello, M. J., Tomás, M. S. J., Isaac, P., Vullo, D. L., & Ferrero, M. A. (2017). PAH removal by immobilized bacterial cells-support systems using low-cost culture media for biomass production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 6-14.
- Al-Maillem, D. M., Kansour, M. K., & Radwan, S. S. (2014). Bioremediation of hydrocarbons contaminating sewage effluent using man-made biofilms: effects of some variables. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(5), 1736-1751.
- Arenskötter, M., Bröker, D., & Steinbüchel, A. (2004). Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6), 3195-3204.
- Argentina Innovadora 2020. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Lineamientos estratégicos 2012-2015. (2011). Secretaría de Planeamiento y Políticas, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Presidencia de la Nación Argentina.
- Argentina Innovadora 2030. Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva. En internet: <https://www.argentina.gob.ar/ciencia/argentina-innovadora-2030>.
- Bautista, P., Mohedano, A. F., Casas, J. A., Zazo, J. A., & Rodríguez, J. J. (2008). An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(10), 1323-1338.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The open microbiology journal*, 9, 48.
- Bermúdez Savón, C. R. (2015) Conferencia 2, Asignatura “Introducción a la Biotecnología”. Maestría en Biotecnología. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.
- Bernatené, E. A., Endler, D. J., Vitale A. A. (2015). Proceso heterogéneo símil Fenton (PHESF) aplicado al tratamiento de efluentes líquidos industriales. *Rumbos Tecnológicos-Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Avellaneda*. Volumen 7, 1-8.
- Bourguignon, N., Isaac, P., Álvarez, H., Amoroso, M. J., & Ferrero, M. A. (2014). Enhanced polyaromatic hydrocarbon degradation by adapted cultures of actinomycete strains. *Journal of basic microbiology*, 54(12), 1288-1294.
- Buragohain, S., Deka, D. C., & Devi, A. (2013). Fenton oxidation and combined Fenton-microbial treatment for remediation of crude oil contaminated soil in Assam-India. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(10), 1913-1920.

- Chen, Y., Lin, J., & Chen, Z. (2017). Remediation of water contaminated with diesel oil using a coupled process: Biological degradation followed by heterogeneous Fenton-like oxidation. *Chemosphere*.
- Chen, Y., Yu, B., Lin, J., Naidu, R., & Chen, Z. (2016). Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. *Chemical Engineering Journal*, 289, 463-470.
- Christensen, A., Gurol, M. D., & Garoma, T. (2009). Treatment of persistent organic compounds by integrated advanced oxidation processes and sequential batch reactor. *Water research*, 43(16), 3910-3921.
- Das, N., Basak, L. V. G., & Salam, J. A. (2012). Application of biofilms on remediation of pollutants—an overview. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(5), 783-790.
- Del Moro, G., Mancini, A., Mascolo, G., & Di Iaconi, C. (2013). Comparison of UV/H₂O₂ based AOP as an end treatment or integrated with biological degradation for treating landfill leachates. *Chemical engineering journal*, 218, 133-137.
- Derudi, M., Venturini, G., Lombardi, G., Nano, G., & Rota, R. (2007). Biodegradation combined with ozone for the remediation of contaminated soils. *European Journal of Soil Biology*, 43(5), 297-303.
- Di Paola, M. M., & Vicién, C. (2010). *Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación*. Buenos Aires.
- Dosta, J., Nieto, J. M., Vila, J., Grifoll, M., & Mata-Álvarez, J. (2011). Phenol removal from hypersaline wastewaters in a membrane biological reactor (MBR): operation and microbiological characterisation. *Bioresource technology*, 102(5), 4013-4020.
- Egli, T. (1995). The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. In *Advances in microbial ecology* (pp. 305-386). Springer, Boston, MA.
- Egli, T. (2002). Microbial degradation of pollutants at low concentrations and in the presence of alternative carbon substrates: emerging patterns. In *Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals* (pp. 131-139). Springer, Dordrecht.
- Gan, S., & Ng, H. K. (2012). Modified Fenton oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soils and the potential of bioremediation as post-treatment. *Science of the total environment*, 419, 240-249.
- Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., & Rodríguez, M. S. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57(4), 222-228.
- Giannakis, S., Vives, F. A. G., Grandjean, D., Magnet, A., De Alencastro, L. F., & Pulgarin, C. (2015). Effect of advanced oxidation processes on the micropollutants and the effluent organic matter contained in municipal wastewater previously treated by three different secondary methods. *Water research*, 84, 295-306.

- Goel, M., Chovelon, J. M., Ferronato, C., Bayard, R., & Sreekrishnan, T. R. (2010). The remediation of wastewater containing 4-chlorophenol using integrated photocatalytic and biological treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 98(1), 1-6.
- Goi, A., Kulik, N., & Trapido, M. (2006). Combined chemical and biological treatment of oil contaminated soil. *Chemosphere*, 63(10), 1754-1763.
- Gong, X. B. (2012). Remediation of weathered petroleum oil-contaminated soil using a combination of biostimulation and modified Fenton oxidation. *International biodeterioration & biodegradation*, 70, 89-95.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., & Vestal, J. R. (1991). Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo [a] pyrene, and carbazole in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3462-3469.
- Halan, B., Buehler, K., & Schmid, A. (2012). Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in biotechnology*, 30(9), 453-465.
- Harms, H., & Bosma, T. N. P. (1997). Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 18(2-3), 97-105.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., & Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(1), 7-12.
- Huang, D., Hu, C., Zeng, G., Cheng, M., Xu, P., Gong, X., ... & Xue, W. (2017). Combination of Fenton processes and biotreatment for wastewater treatment and soil remediation. *Science of the Total Environment*, 574, 1599-1610.
- Hussain, K., Hoque, R. R., Balachandran, S., Medhi, S., Idris, M. G., Rahman, M., & Hussain, F. L. (2018). Monitoring and risk analysis of PAH in the environment. *Handbook of Environmental Materials Management*, 1-35.
- Informe del Estado del Ambiente. Edición 2016. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación Argentina.
- Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM). En internet: <http://www.iram.org.ar/>
- Ioannou, L. A., Puma, G. L., & Fatta-Kassinos, D. (2015). Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. *Journal of hazardous materials*, 286, 343-368.
- Isaac, P., Alessandrello, M. J., Macedo, A. J., Estévez, M. C., & Ferrero, M. A. (2017). Pre-exposition to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance biofilm formation and hydrocarbon removal by native multi-species consortium. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(2), 1372-1378.
- Isaac, P., Martínez, F. L., Bourguignon, N., Sánchez, L. A., & Ferrero, M. A. (2015). Improved PAH removal performance by a defined bacterial consortium of indigenous

Pseudomonas and actinobacteria from Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 101, 23-31.

Isaac, P., Sánchez, L. A., Bourguignon, N., Cabral, M. E., & Ferrero, M. A. (2013). Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, 207-214.

Jho, E. H., Ryu, H., Shin, D., Kim, Y. J., Choi, Y. J., & Nam, K. (2013). Prediction of landfarming period using degradation kinetics of petroleum hydrocarbons: test with artificially contaminated and field-aged soils and commercially available bacterial cultures. *Journal of soils and sediments*, 14(1), 138-145.

Jiang, C., Pang, S., Ouyang, F., Ma, J., & Jiang, J. (2010). A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1-3), 813-817.

Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*, 133(1), 71-84.

Juárez Tomás, M. S., Carrasco, M. G., Lobo, C. B., Alessandrello, M. J., Sánchez, L., & Ferrero, M. A. (2019). PAH removal by simultaneous and sequential inoculation of *Pseudomonas monteilii* P26 and *Gordonia* sp. H19 in the presence of biostimulants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 144, 104752.

Kadakol, J. C., Kamanavalli, C. M., & Shouche, Y. (2011). Biodegradation of Carbofuran phenol by free and immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883T. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 25-29.

Kargi, F., & Eker, S. (2005). Removal of 2, 4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 40(6), 2105-2111.

Kästner, M., Breuer-Jammali, M., & Mahro, B. (1998). Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 359-362.

Kim, Y. M., Ahn, C. K., Woo, S. H., Jung, G. Y., & Park, J. M. (2009). Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *Journal of biotechnology*, 144(4), 293-298.

Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., & Tuhkanen, T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 78(4), 382-391.

Li, C., Li, Y., Cheng, X., Feng, L., Xi, C., & Zhang, Y. (2013). Immobilization of *Rhodococcus rhodochrous* BX2 (an acetonitrile-degrading bacterium) with biofilm-forming bacteria for wastewater treatment. *Bioresource technology*, 131, 390-396.

- Li, X., Cao, X., Wu, G., Temple, T., Coulon, F., & Sui, H. (2014). Ozonation of diesel–fuel contaminated sand and the implications for remediation end-points. *Chemosphere*, 109, 71-76.
- Lim, M. W., Von Lau, E., & Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—Present works and future directions. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 14-45.
- Lu, M., Zhang, Z., Qiao, W., Wei, X., Guan, Y., Ma, Q., & Guan, Y. (2010). Remediation of petroleum-contaminated soil after composting by sequential treatment with Fenton-like oxidation and biodegradation. *Bioresource technology*, 101(7), 2106-2113.
- Macchi, M., Festa, S., Vega-Vela, N. E., Morelli, I. S., & Coppotelli, B. M. (2019). Assessing interactions, predicting function, and increasing degradation potential of a PAH-degrading bacterial consortium by effect of an inoculant strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(25), 25932-25944.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunalp, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* 12 ed.
- Madsen, T., & Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(4), 631-637.
- Mandal, T., Dasgupta, D., Mandal, S., & Datta, S. (2010). Treatment of leather industry wastewater by aerobic biological and Fenton oxidation process. *Journal of hazardous materials*, 180(1-3), 204-211.
- Mangwani, N., Shukla, S. K., Kumari, S., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Characterization of *S tenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of applied microbiology*, 117(4), 1012-1024.
- Martínez-Trujillo, M. A., & García-Rivero, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 55-73.
- Medina, R., Di Clemente, N., Rosso, J. A., & Del Panno, M. T. (2014, November). Remediación de un suelo crónicamente contaminado con Hidrocarburos mediante oxidación química y compost. In *Congreso Latinoamericano y Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo* (Vol. 20).
- Méndez Cabezas, A. R. (2013). "Evaluación de la actividad microbiana presente en el suelo, en respuesta a la aplicación del abono orgánico compost y su efecto en la producción de pastos. Cayambe-Ecuador 2012" (Bachelor's thesis).
- Mendoza, R. (2018). Biorremediación de suelos contaminados con petróleo. Museo Argentino de Ciencias Naturales, MACN-CONICET. En: Brutti, L. N., Beltrán, M. J., & García de Salamone, I. (2018). *Biorremediación de los recursos naturales* (Capítulo 9). Ediciones INTA.
- National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. En internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Neyens, E., & Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous materials*, 98(1-3), 33-50.
- Oh, S. Y., & Shin, D. S. (2014). Treatment of diesel-contaminated soil by fenton and persulfate oxidation with zero-valent iron. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 23(2), 180-193.
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100526.
- Parellada, E. A., Ferrero, M., Cartagena, E., Bardón, A., & Neske, A. (2013). Laherradurin, a natural stressor, stimulates QS mechanism involved in biofilm formation of a PAH degrading bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 78-84.
- Parellada, E. A., Ramos, A. N., Ferrero, M., Cartagena, E., Bardón, A., Valdez, J. C., & Neske, A. (2011). Squamocin mode of action to stimulate biofilm formation of *Pseudomonas plecoglossicida* J26, a PAH degrading bacterium. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(7), 1066-1072.
- Peluffo, M. (2016). *Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante oxidación química* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Pozzo Ardizzi MG. (2018). La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. Geociencia S.R.L. En: *Brutti, L. N., Beltrán, M. J., & García de Salamone, I. (2018). Biorremediación de los recursos naturales (Capítulo 8). Ediciones INTA.*
- Rafin, C., Veignie, E., Fayeulle, A., & Surpateanu, G. (2009). Benzo [a] pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins. *Bioresource technology*, 100(12), 3157-3160.
- Ren, R. Y., Yang, L. H., Han, J. L., Cheng, H. Y., Ajibade, F. O., Guadie, A., ... & Wang, A. J. (2020). Perylene pigment wastewater treatment by fenton-enhanced biological process. *Environmental research*, 186, 109522.
- Rodríguez, S., & Bishop, P. L. (2008). Enhancing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Effects of nonionic surfactant addition on biofilm function and structure. *Journal of Environmental Engineering*, 134(7), 505-512.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 249-252.
- Samhan, F., Elliethy, M., Hemdan, B., Youssef, M., & El-Taweel, G. (2017). Bioremediation of oil-contaminated water by bacterial consortium immobilized on environment-friendly biocarriers. *Journal of Egyptian Public Health Association*, 92(1), 44-51.
- Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., & Birnbaum, S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon

supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental pollution*, 136(1), 187-195.

Shahsavari, E., Poi, G., Aburto-Medina, A., Haleyur, N., & Ball, A. S. (2017). Bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon-contaminated environments. In *Enhancing cleanup of environmental pollutants* (pp. 21-41). Springer, Cham.

Sherwood, M. K., & Cassidy, D. P. (2014). Modified Fenton oxidation of diesel fuel in arctic soils rich in organic matter and iron. *Chemosphere*, 113, 56-61.

Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Biofilm-mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microbial biodegradation and bioremediation*, 203-232.

Silva-Castro, G. A., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., & Calvo, C. (2013). Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: assays in a pilot plant. *Science of the Total Environment*, 445, 347-355.

Singh, R., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in microbiology*, 14(9), 389-397.

Sirtori, C., Zapata, A., Oller, I., Gernjak, W., Aguera, A., & Malato, S. (2009). Solar photo-Fenton as finishing step for biological treatment of a pharmaceutical wastewater. *Environmental science & technology*, 43(4), 1185-1191.

Sistema de Información Normativa y Documental Malvinas Argentinas. Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. En internet: <https://normas.gba.gob.ar/>.

Tribelli, P. M., Di Martino, C., López, N. I., & Iustman, L. J. R. (2012). Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation*, 23(5), 645-651.

Universidad de Granada, España. Departamento de Microbiología. En internet: https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=465&Itemid=525

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. En internet: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/12_MedicionCrecimiento_27210.pdf

Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christie-Oleza, J., Ferrero, M.,... & Mac Cormack, W. P. (2013). Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 22-30.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.

Villa, R. D., Trovó, A. G., & Nogueira, R. F. P. (2010). Diesel degradation in soil by fenton process. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6), 1089-1095.

- Vojtková, H., Kosina, M., Sedláček, I., Mašlaňová, I., Harwotová, M., & Molinková, V. (2015). Characterization of *Pseudomonas monteilii* CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. *Folia microbiologica*, 60(5), 411-416.
- Wang, N., Zheng, T., Zhang, G., & Wang, P. (2016). A review on Fenton-like processes for organic wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 762-787.
- Xu, P., Han, H., Hou, B., Zhuang, H., Jia, S., Wang, D., ... & Zhao, Q. (2015a). The feasibility of using combined TiO₂ photocatalysis oxidation and MBBR process for advanced treatment of biologically pretreated coal gasification wastewater. *Bioresource technology*, 189, 417-420.
- Xu, P., Han, H., Zhuang, H., Hou, B., Jia, S., Xu, C., & Wang, D. (2015b). Advanced treatment of biologically pretreated coal gasification wastewater by a novel integration of heterogeneous Fenton oxidation and biological process. *Bioresource technology*, 182, 389-392.
- Yap, C. L., Gan, S., & Ng, H. K. (2011). Fenton based remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. *Chemosphere*, 83(11), 1414-1430.
- Yordanova, G., Ivanova, D., Godjevargova, T., & Krastanov, A. (2009). Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL 3112 on modified polyacrylonitrile membrane. *Biodegradation*, 20(5), 717-726.
- Zapata, A., Oller, I., Gallay, R., Pulgarin, C., Maldonado, M. I., Malato, S., & Gernjak, W. (2008). Comparison of photo-Fenton treatment and coupled photo-Fenton and biological treatment for detoxification of pharmaceutical industry contaminants. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 11(2), 261-269.
- Zhang X, Lai K, Wang S (2008) A new approach for crude oil price analysis based on Empirical Mode decomposition. *Energ econ* 30:905-918.
- Zhang, L. S., Wu, W. Z., & Wang, J. L. (2007). Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of environmental sciences*, 19(11), 1293-1297.